ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. V No 3 – 4

Too old.

NSP
RAM
MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
23 OCT 1963

1 9 5 6

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 40,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. V No 3–4

1956
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Natalia Balicka

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Nakład 1305 + 88 egz.	Oddano do składania 14. 8. 56 r.
Ark. wyd. 11,25; druk. 6,75.	Podpisano do druku 4. 3. 57 r.
Papier bezdrz. 80 g, 70 × 100.	Druk ukończono w marcu 1957 r.
Cena zł 30.—	Nr zam. 1033/56 — F-11

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 315 - 317

W. Drożański

FATAL BACTERIAL INFECTION IN SOIL AMOEBAE *

from the Department of General Microbiology, Marie Curie-Skłodowska University, Lublin

Received 1 Juni 1956

During the screening of soil amoebae for food preferences there was observed the lysis of rhisopods on some agar-plates.

A brief study of this phenomenon showed that the lysis was due to the infection of amoebae with an unknown rodlike bacterium.

The amoeba, classified as *Acanthamoeba sp.* (phot. 1), isolated from soil, was cultured on saline-agaroid plates with *Aerobacter aerogenes* as a source of nourishment.

The factor destroying amoebae could be transfered from lysed culture into new one in several serial passages.

The cysts of a healthy not-infected culture of *Acanthamoeba* have been transfered to an agaroid-plate covered with heavy suspension of *A. aerobacter* and mixed with a loopfull of the lysate from infected culture. The excystment was observed in normal time (7-8 hours at 22°). Many rodlike bacteria were seen swimming lively in a film of the water condensed on the agaroid surface. After some hours many rodlike bacteria gathered near by the amoeba cells and formed a tail-like group, depicted in figure 1.

The first pathological symptoms appeared after 18-20 hours. The infected individuals rounded up. Many lively moving rods were whirling in the cytoplasm (phot. 2).

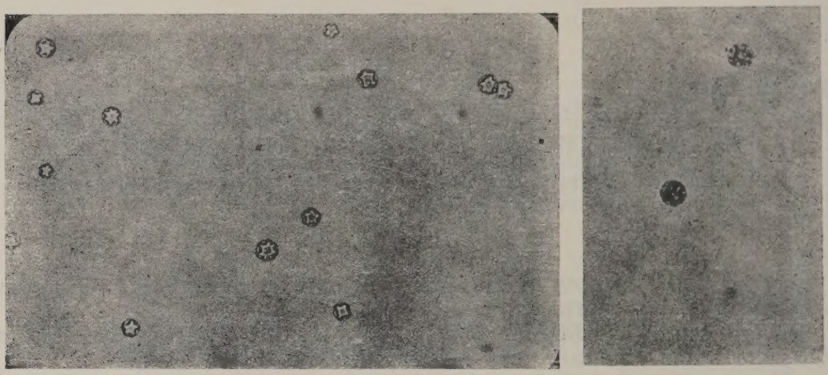
This stadium of „whirling" cells continued for 5 till 55 minuts and ended with an abrupt burst of amoebae releasing numerous parasite cells. Sometimes amoeba did not burst but its cell was slowly dissolved.

The infecting factor was isolated in the pure culture. It was shown to be a thin, long rod-like bacteria (0,5-0,6×3-3,5 μ), gram-negative, forming no spores, vividly moving, probably furnished with one polar flagellum.

On nutrient agar it forms circular, low, concave, smooth colonies. Nutrient broth was clouded and thick, whitish growth was observed near the surface.

* This is a partial report on a research of biology of soil amoebae conducted under the direction of Professor Dr Władysław Kunicki-Goldfinger (Department of Microbiology, Wrocław University, Wrocław).

It fermented glucose with formation of acid only. Lactose, levulose, saccharose, maltose, arabinose, raffinose, glicerol and mannitol were not fermented. Lithmus milk alkalised; Voges-Proskauer reaction negative, indol formed; nitrite from nitrate not formed; H_2S not formed. It grows in mineral media with $NaNO_3$ or $(NH_4)_2SO_4$ as the only source of nitrogen.



Fot. 1. Cysty *Acanthamoeba sp.*
Fot. 2. Zakażone ameby. Ciało zaokrąglone, wewnątrz liczne komórki bakteryjne.

Phot. 1. Cysts of *Acanthamoeba sp.*
Phot. 2. Infected vegetative cells of amoeba; The body rounded, with many bacteria in the cytoplasm.

Rys. 1. Skupienie bakterii w kształcie „ogona", poprzedzające śmiertelną infekcję.
Rys. 2. Skupienie bakterii wokół ameb w kształcie „otoczki" w przypadkach nieskutecznej infekcji.

Fig. 1. The infecting bacteria grouped in the form of a „tail" behind the cell of amoeba. The forming of „tails" is a first symptom of a fatal infection.
Fig. 2. The infecting bacteria groped around the cell of amoeba in case of an inefective infection.

The disease can be reproduced by inoculation of the pure culture of this bacterium.

The results of infection-experiments depended on the external conditions.

It was particularly noticeable that the infection was ineffective if the dosage of infecting bacteria was too big and when the surface film of water was too thick.

The parasites were freely moving in the fluid and gathered near amoeba-cells but instead of „tail" a bacterial halo was formed around protozoon (fig. 2). The incubation period was prolonged and characteristic symptoms of the disease (rounding up, whirling of bacteria in the cytoplasm, bursting of the cell) were rarely or not at all observed.

In the similar conditions (the thick surface film of water) the diminished number of bacteria caused fatal disease and total destroying of all amoebae.

How the bacteria enter the amoeba was at present not determined.

The nature of a resistance to infection in amoebae, the mode of infection and the mechanism of injurious effect of the parasite are now studied and will be reported in future notes.

Nevertheless in this case the Koch's postulates have been fulfilled and the isolated bacterium resembling *Pseudomonas* was shown to be the agent of fatal disease of amoebae.

The bacterial fatal infection in amoebae does not appear to have been previously described so far as the writer can ascertain on the basis of a survey of available literature.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 319

J. Pawełkiewicz and *K. Zodrow*

THE SYNTHESIS OF COBALAMINS BY *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE*

(PRELIMINARY NOTE)

From the Department of General Chemistry and the Department of Agricultural Microbiology of High School of Agriculture, Poznań

Received 1 Juni 1956

In a preceding paper (Pawełkiewicz, Zodrow, 1956) we showed the similarity of some biochemical features between *Propionibacterium shermanii* and *Corynebacterium diphteriae*. In both species iron ions have inhibited the synthesis of free porphyrins and so have cobaltous ions (Pawełkiewicz, Zodrow, 1956; Clarke, Clarke, 1953).

These observations have permitted us to suggest a hypothesis of biosynthesis of cobalamins. Simultaneously we supposed that *C. diphteriae* should produce cobalamins just as propionic acid bacteria do.

We examined 14 strains of *C. diphteriae* from type culture collections as well as isolated from patients. We have found that all investigated strains produced cobalamins. One strain (*C. diphteriae N° 44* from Państwowy Zakład Higieny, Warszawa) produced over 2 mg cobalamins in 1 l of culture.

Some of the investigated strains synthesized at least four cobalamins. They are probably 2-methyladeninecyancobalamin (Factor A), adeninecyancobalamin (pseudovitamin B_{12}), vitamin B_{12p} (Factor B, desnucleotidecyancobalamin) and ionophoretically neutral cobalamin. The latter cobalamin appears in the greatest quantities and is easily adsorbed in a dicyanid form from water solutions on acid-washed alumina. Its absorption spectrum is identical with that of vitamin B_{12p} (desnucleotidecyancobalamin).

REFERENCES

1. Clarke W. A., Clarke G. D., 1953: The mechanism of the effect of iron and cobalt on the production of toxin by *Corynebacterium diphteriae*, *Biochem. J.*, 55: XVI.
2. Pawełkiewicz J., Zodrow K., 1956: Wytwarzanie wolnych porfiryn przez *Propionibacterium shermanii*, *Acta Biochim. Polon.*, 3, in press.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 321 - 351

J. Kwapiński

BADANIA NAD BUDOWĄ ANTYGENOWĄ MACZUGOWCA BŁONICY

Z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie

Wpłynęło 1 marca 1956

Celem pracy było systematyczne zbadanie budowy antygenowej maczugowca błonicy (szczepu *Park Williams Nr 8*) oraz właściwości biologicznych poszczególnych frakcji chemicznych maczugowca.

Dotychczas ogłoszone badania * nad antygenami maczugowców można podzielić na dwie grupy:

1. Wykrywanie antygenów przy użyciu metod serologicznych z uwzględnieniem fizycznych właściwości antygenów.

2. Badanie immunologicznych właściwości składników chemicznych oddzielonych lub wyizolowanych z maczugowców błonicy przy użyciu metod chemicznych.

Do pierwszej grupy należą przeważnie prace starsze, chociaż w nowszym piśmiennictwie również znajduje się szereg doświadczeń tego typu.

Posługiwanie się całymi komórkami maczugowców w odczynach serologicznych jest czasem trudne i ma wartość problematyczną z powodu znacznej skłonności maczugowców do samoistnej aglutynacji w roztworze soli lub surowicy. Może to być częściowo przyczyną niejednolitych wyników otrzymanych przez różnych autorów w badaniach nad serologicznym różnicowaniem maczugowców metodą aglutynacji.

Przewoski (1912) oraz Langer (1916) nie mogli wykazać różnic biologicznych wśród szczepów maczugowców błonicy, które ponad to posiadały pewne pokrewieństwo serologiczne z *C. hofmannii*. Inni natomiast badacze odróżnili 2 lub więcej typów serologicznych wśród maczugowców, a mianowicie: Havens (1920) — 2 typy, Bell (1922) — 3 typy, Durand (1918, 1920, 1921), Orr-Ewing (1933), oraz Robinson i Peeney (1936) — 5 typów, Eagleton i Baxter (1923) — 10, Nishimoto (1936) — 13, a Hewitt (1947) — 13 typów serologicznych w obrębie grupy *gravis*, 4 w grupie *intermedius* i 4 w grupie *mitis*.

Metodą aglutynacji nie wykazano różnic antygenowych między maczugowcami błonicy i innymi gatunkami rodzaju *Corynebacterium*. Reakcje krzyżowe występowały między szczepami niezjadliwych maczugowców błonicy, *C. hofmannii* i *C. xerose* (Bailey, 1925).

* Szczegółowy przegląd badań nad budową chemiczną, antygenową i właściwościami biologicznymi będzie zamieszczony w oddzielnej pracy w „*Acta Microbiologica Polonica*" w 1957 r.

Uwzględniając wrażliwość lub oporność na podwyższoną temperaturę Lautrop (1950), Wong i T'Ung (1938, 1939, 1940) oraz Oeding (1949) odróżnili w maczugowcach błonicy ciepłochwiejny, powierzchniowo-somatyczny, typowo swoisty antygen *K* oraz ciepłostały, somatyczny, grupowo swoisty antygen *O*.

W obrębie antygenu *O* odróżniono następnie dwa odmienne typy *1* i *2*. Większość szczepów zawiera wspólny antygen somatyczny *1*; szczepy *mitis* zawierają jednak antygen *2*.

Antygen *O* grupowo-swoisty wykryty został również w komórkach *C. hofmannii* i *C. ovis*. Antygen *O* może być przyczyną krzyżowych reakcji serologicznych między typami różnych grup, gdyż zwykłe typowe surowice, przygotowane przez uodpornienie królików formalinowanymi lub zabitymi ciepłem maczugowcami, zawierają grupowe aglutyniny *O*; przejrzyste wyniki uzyskuje się używając typowych surowic, z których usunięto przeciwciała grupowe.

Antygen *K*, zwany przez Oedinga *Ld*, związany jest z białkową frakcją maczugowców rozpuszczalną w zasadach. Antygen *O* znajduje się we frakcjach wielocukrowych (Wong i T'Ung, 1939). Chemiczny charakter i budowa antygenów *O* i *K* dotychczas nie zostały zbadane.

Serologiczne różnice dotyczące maczugowców błonicy nie są związane ze zjadliwością maczugowców ani z właściwościami wytwarzanej przez nie toksyny: (Durand 1918, Havens 1920, Bell 1922, Mann 1922, Poxson i Redovitz 1922, Nishimoto 1936).

Podziałowi maczugowców na typy serologiczne, opartemu na badaniach metodą aglutynacji, nie odpowiadają wyniki uzyskane metodą wiązania dopełniacza. Odczyn wiązania dopełniacza z całymi komórkami maczugowców błonicy jako antygenem nie pozwala na wyraźne odróżnienie typów serologicznych (Kolmer 1912, Przewoski 1912, Mansheim 1930). Odczyn ten wskazuje natomiast na znaczne pokrewieństwo serologiczne między szczepami wszystkich trzech grup morfologicznych, a zwłaszcza grup *gravis* i *intermedius* (Stone 1924, Oeding 1949).

Źródłem niepowodzeń przy odczynie wiązania dopełniacza bywa często antykomplementarność „całkowitego" antygenu maczugowców; przyczyną jej może być częściowo frakcja lipidowa.

Badania immunologicznych właściwości wyizolowanych frakcji i składników maczugowców są reprezentowane w literaturze nielicznie i urywkowo.

Preparaty białkowe uzyskane przez Wonga i T'Unga (1939, 1949) z dwu szczepów maczugowców błonicy dawały zwykłe reakcje barwne na białko; ulegały wytrąceniu solami obojętnymi oraz kwasem trójchlorooctowym i garbnikowym. Odczyn Molischa w rozcieńczeniu frakcji białkowych 1 : 500 ujemny. Ekstrahowanie białek eterem nie niszczyło ich swoistości typowej, a tylko zmniejszało ich aktywność serologiczną, co wskazuje, że frakcja proteinowa nie była kompleksem lipidowym.

Preparaty białkowe Wonga i T'Unga wykazywały na ogół swoistość dla typu; niektóre preparaty, np. otrzymane ze szczepu PW_8 były ciepłochwiejne; pod wpływem ogrzewania w 56° przez 30 minut białko zmieniało się pod względem immunologicznym w gatunkowo swoiste. Ta konwersja odbywała się tym łatwiej, im czynniejszy serologicznie był dany preparat. Większość stanowiły preparaty proteinowe, które nie traciły

swoistości typowej i aktywności serologicznej po ogrzewaniu w 122° przez 20 minut. Proteiny przygotowane przy użyciu 1-procentowego KOH w gotującej łaźni wodnej były natomiast gatunkowo swoiste o niskiej aktywności serologicznej.

Stwierdzono pewne różnice aktywności serologicznej protein wyizolowanych z poszczególnych szczepów maczugowców. Jak wspomniano, antygeny białkowe na ogół były typowo swoiste; jednak po wyabsorbowaniu nierozcieńczonych surowic typowo swoistych szczepami innych typów, miana ich w stosunku do antygenów homologicznych ulegały około 10-krotnemu obniżeniu. Zjawisko to może tłumaczyć reakcje krzyżowe obserwowane w odczynie aglutynacyjnym u tych szczepów maczugowców.

Nie badano oddziaływania frakcji proteinowych maczugowców z surowicą antytoksyczną; natomiast wykonano (Pillemer, Toll, Badger 1947) odwrotną próbę odczynu precypitacyjnego frakcji P V oczyszczonej toksyny błoniczej w surowicy odpornościowej przeciwmaczugowcowej — z wynikiem dodatnim.

Spanedda (1937) wykazał, że surowice królików uodpornionych różnymi szczepami maczugowców reagują z przesączem hodowli szczepów homologicznych. Wskazywałoby to na pokrewieństwo antygenowe pewnych składników toksyny i maczugowców błonicy. Wniosek taki wynika również z badań Fuksa (1954).

Antygenowe frakcje cukrowe uzyskane przez Wonga i T'Unga (1938, 1940) z różnych gatunków rodzajów *Corynebacterium* miały następujące właściwości antygenowe: większość surowic królików uodpornionych maczugowcami reagowała z homologicznym wielocukrowcem do miana 1 : 100 000. Surowice dla maczugowców grupy *gravis*, *mitis*, *intermedius* ulegały całkowitej absorpcji z homologicznym i heterologicznym wielocukrowcem, a także wielocukrowcem niezjadliwego maczugowca.

Wielocukrowce wyizolowane z *C. xerose* reagowały z surowicami dla maczugowców błonicy wszystkich grup w rozcieńczeniu 1 : 100 000, natomiast wielocukrowiec *C. hofmannii* reagował z tymi surowicami słabo w rozcieńczeniu 1 : 1000.

Cukrowce maczugowców błonicy, podobnie jak cukrowce *C. xerose*, oddziaływały z surowicą królików uodpornionych komórkami *C. xerose*, rozcieńczoną 1 : 100 000.

Surowica przeciw maczugowcom Hofmanna oddziaływała tylko z homologicznym wielocukrowcem 1 : 100 000, a nie reagowała z heterologicznymi cukrowcami.

Obserwacje te wskazują na słuszność poglądu Jungenbluta, według którego dyfteroidy są „zdegradowanymi" szczepami prawdziwych maczugowców błonicy.

Frakcje cukrowe uzyskane przez Gubariewa i współprac. (1941, 1942, 1945, 1948, 1951, 1952, 1953) oraz Orłową (1950, 1953) okazały się serologicznie nieaktywne, czego przyczyną były zapewne zbyt drastyczne środki użyte w celu ich wyizolowania.

Frakcje lipidowe uzyskane przez Wonga i T'Unga (1940) z komórek maczugowców błonicy, *C. xerose*, *C. hofmannii* i dyfteroidów okazały się wspólne dla rodzaju *Corynebacterium*. Nie jest wykluczone, że pokrewieństwo antygenowe lipidów maczugowców rozciąga się na inne rodzaje bakterii. Wskazują na to badania Stubera (1915), który stwier-

dził, że wstrzyknięcie lipidów maczugowców błonicy podskórnie zwierzętom doświadczalnym wywołuje aglutyniny dla *Salmonella typhi* (miano 1 : 600).

WŁAŚCIWOŚCI ANTYGENOWE TOKSYNY BŁONICZEJ

Toksyna wytworzona przez maczugowce błonicy nie jest substancją jednolitą pod względem serologicznym.

Z przesączu hodowli *C. diphteriae* Pappenheimer i Lawrence (1948) wyosobnili 2 frakcje białkowe o różnych właściwościach serologicznych; podobne spostrzeżenia podał O'Meara (1950).

Fuks (1954), posługując się metodą serologiczną, wykrył białka maczugowców błonicy w anatoksynie, lecz nie przypisuje im właściwości immunogennych.

Metodą precypitacji w żelu Pope i Stevens (1951) wykazali, że w przesączach szczepu PW_8 znajduje się około 25 antygenów. Część antygenów to enzymy proteolityczne, wykazujące maksimum aktywności w charakterystycznych *pH* i zobojętniane swoistymi przeciwciałami znajdującymi się w hyperimmunizowanej surowicy końskiej. Obok nich znajdują się resztki haptenowe. Wysoce oczyszczona toksyna Pappenheimera zawiera 14 antygenów. Drogą specjalnego oczyszczania Pope i współprac. uzyskali preparaty złożone z 3 składników antygenowych. Oczyszczona bardzo gruntownie toksyna maczugowców błonicy traci swoją antygenowość i toksyczność.

Lahiri (1952) wykazał, że podczas wzrostu maczugowców błonicy (na bulionie cielęcym z proteozo-peptonem) wytwarzane są pewne substancje, „adiuwanty", które mogą wzmagać immunogenne właściwości oczyszczonego toksoidu błonniczego. Substancje te, odpadające przy oczyszczaniu toksoidu, są dobrze rozpuszczalne w wodzie, adsorbują się na węglu aktywowanym, z którego można je eluować rozcieńczonym NaOH. Oprócz nich znajdują się zanieczyszczenia nie rozpuszczalne w wodzie oraz rozpuszczalne, lecz nie adsorbujące się na węglu aktywowanym. Zanieczyszczenia te hamują immunogenne właściwości toksoidu lub są względem nich obojętne. Same „adiuwanty", wstrzyknięte bez toksoidu śwince morskiej, nie wywołują odporności przeciwbłoniczej. Charakter chemiczny „adiuwantów" nie został zbadany, zależy on jednak w znacznym stopniu od składników pożywki.

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE MACZUGOWCÓW BŁONICY

1. Alergia

Ströder i Schneider (1954) badali reakcję na śródskórne wprowadzenie głównych składników chemicznych maczugowców błonicy do ustroju dzieci zdrowych oraz chorych na błonicę, płonicę lub gruźlicę. Zaobserwowano następujące reakcje:

a) po wstrzyknięciu nukleoproteidów oraz frakcji proteinowej rozpuszczalnej w etanolu obrzęk okolicznych węzłów chłonnych, podwyższenie temperatury; na skórze w okolicy wstrzyknięcia nieznaczne zaczerwienienie w ciągu 15 minut oraz późna reakcja po 24 - 36 godzinach; u osobników Schick (+) odczyn silniejszy,

b) po wstrzyknięciu wielocukrów (3% N i 1,7% P): zaczerwienienie utrzymujące się 10 minut u dzieci zdrowych, 1 - 2 godzin u chorych na błonicę; późny rumień u wszystkich dzieci,

c) po wstrzyknięciu lipidów rozpuszczalnych w acetonie i alkoholu występowała szybko burzliwa reakcja w okolicy wstrzyknięcia; obrzęk, zaczerwienienie, po 20 minutach rumień, później martwica.

Odczyny po wszystkich frakcjach były silniejsze u dzieci chorych na błonicę lub płonicę niż u zdrowych lub chorych na gruźlicę. Jest możliwe, że reakcje na substancje maczugowców błonicy są wyrazem alergii manifestującej się w narządzie skórnym.

Hirsch (1932) stwierdził, że wyciągi wodne suchej masy maczugowców błonicy zabijały świnki morskie przy typowych objawach zatrucia toksyną błoniczą. Zawartości substancji toksycznej i azotu w wyciągach były przy tym niezależne od siebie; ze wzrostem temperatury przy ekstrakcji wodą uwalniała się większa ilość jodu a mniejsza azotu; odwrotne zjawisko występowało w przypadku ekstrahowania roztworem fosforanu.

2. Właściwości uodporniające

Wstrzykiwanie toksoidu błoniczego do ustroju zwierząt i ludzi wywołuje powstawanie antytoksyny; natomiast wstrzykiwanie zabitych maczugowców powoduje wzrost bakteriobójczej mocy surowicy oraz wskaźnika opsonicznego (Wildführ, 1950).

Uodporniające działanie toksoidu waha się zależnie od stopnia jego zanieczyszczenia.

Murata i Kurakawa (1952) wykazali, że frakcje toksoidu wytrącone siarczanem amonu w stężeniu poniżej 30-procentowym posiadały mniejszą moc uodporniającą niż frakcje wytrącone bardziej stężonymi roztworami.

Wydaje się, że wstrzykiwanie samego toksoidu, zwłaszcza oczyszczonego, nie zawsze powoduje wystarczającą odporność lub czasem w ogóle jej nie wzbudza. Simic i Ivanic (1931) wykazali u zwierząt skuteczne działanie lecznicze surowicy wysokowartościowej, uzyskanej po uodpornieniu królików specjalnymi szczepami maczugowców błonicy wywołującymi bakteriemię. Surowica ta miała wysokie miano przeciwbakteryjne, niskie antytoksyczne.

Możliwość i skuteczność uodpornienia zwierząt przeciw błonicy niektórymi frakcjami maczugowców błonicy wykazana została w moich badaniach. Zagadnienie to jest ważne dlatego, że surowica przeciwtoksyczna nie zawiera wszystkich przeciwciał przeciw maczugowcom błonicy, a ponadto istnienie okresu bakteriemii, zwłaszcza we wczesnym stadium zakażenia oraz w ciężkich postaciach błonicy, zostało udowodnione przez wielu badaczy (Przesmycki, Goliborska, Lachowicz, Seydel, 1938 i inni).

BADANIA WŁASNE

MATERIAŁ

Szczepy bakteryjne: szczepy maczugowców błonicy PW_8 oraz szczep maczugowców rzekomo błoniczych (*Corynebacterium hofmannii*) *Nr 124*, otrzymano z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Szczepy te hodowano na pożywce Popego. Hodowlę 36-godzinną odwirowano i osad dokładnie przemyto pięciokrotnie

jałowym roztworem 0,85-procentowego NaCl. Po wysuszeniu w temperaturze 37° otrzymano 470 g szczepu PW_8 oraz 19,5 g szczepu *124*. Sucha masa wynosiła około 19% wagi wilgotnej szczepu PW_8.

Surowice odpornościowe. Króliki wagi 3200 - 3500 g uodporniano przez dożylne wstrzykiwanie ogrzanych w temperaturze 100° przez 10 minut zawiesin szczepów PW_8 i *124* lub toksoidu i toksyny błoniczej, wytworzonych przez Państwowy Zakład Higieny w Warszawie (toksoid przeznaczony do szczepień ochronnych przeciw błonicy). Wstrzykiwanie szczepów PW_8 i *124* rozpoczynano od dawki 0,5 ml zawiesiny, której gęstość optyczna wynosiła D=20 (oznaczona w fotokolorymetrze Jouana); przy dalszych iniekcjach, powtarzanych co 3 - 4 dni, gęstość zawiesiny zwiększono o 10 aż do końcowej gęstości optycznej D=50; taką zawiesinę wprowadzono jeszcze pięć do sześć razy, łącznie po 9 - 10 wstrzyknięć. Uodpornianie toksoidem rozpoczynano wstrzyknięciami śródmięśniowymi 0,5 i 1,0 ml toksoidu, po czym następowały iniekcje dożylne: 0,5 ml toksoidu rozcieńczonego roztworem fizjologicznym 1 : 10, 1 : 5 i nierozcieńczonego 0,5 i 1 ml (dwukrotnie), wreszcie toksyny rozcieńczonej 1 : 20, 1 : 10, 1 : 5 po 0,5 ml. Uzyskawszy odpowiednie miano surowicy odpornościowej krew królików zbierano, oddzielano surowicę i przechowywano ją w zamrażarce w temperaturze 20° do chwili użycia.

Zwierzęta doświadczalne. Próby toksyczności preparatów otrzymanych z maczugowców błonicy drogą chemicznego frakcjonowania wykonywano na myszkach białych wagi około 20 g lub na świnkach morskich wagi 400 - 500 g. Do odczynów skórnych użyto świnek morskich i królików albinosów. Badania immunologicznych właściwości frakcji maczugowców błonicy *in vivo* wykonano na świnkach morskich wagi 300 - 400 g.

Przygotowanie frakcji chemicznych maczugowców błonicy. Przemyte maczugowce błonicy, zawieszone w roztworze fizjologicznym poddano 30-krotnemu zamrożeniu w zamrażarce oraz odtajaniu w ciepłej wodzie, po czym wysuszono w cieplarce w temperaturze 37°.

Maczugowce błonicy frakcjonowano chemicznie w następujący sposób (schemat 1): Dodawano mieszaninę (1 : 1) alkoholu etylowego i eteru zalewając masę bakteryjną dziesięciokrotnie większą ilością mieszaniny. Ekstrakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej, często silnie wstrząsając. Płyn ekstrahujący zmieniano trzykrotnie co 7 - 10 dni. Wszystkie wyciągi alkoholo-eterowe złączone razem, przesączano przez bibułę i przez sączek Seitza oraz zagęszczano przy obniżonym ciśnieniu w 60 - 70°. Otrzymano 26,12 g masy o konsystencji wosku, barwy brunatnej, zawieszalnej w roztworze fizjologicznym w postaci emulsji. Jest to frakcja lipidów wolnych L_1.

Pozostałą masę bakteryjną ekstrahowano 2 - 3,5 litrami chloroformu, zmieniając chloroform trzykrotnie co 7 - 9 dni. Wszystkie wyciągi chloroformowe złączono, przesączono przez bibułę i sączek Seitza oraz zagęszczono przy obniżonym ciśnieniu w 60 - 70°. Uzyskano 22,5 g suchej masy o konsystencji miękkiego wosku barwy ciemnobrunatnej, nie rozpuszczalnej w eterze i w wodzie. Jest to frakcja lipidowa (woskowa) L_2.

Pozostałą masę bakteryjną ekstrahowano mieszaniną alkoholu i eteru (1 : 1) z dodatkiem 1-procentowego kwasu solnego. Płyn zmieniano trzykrotnie co 7 dni. Wszystkie wyciągi złączono, przesączono i zagęszczono jak wyżej. Uzyskano 6 g masy o konsystencji dość miękkiej, barwy brunatnej. Są to lipidy związane, frakcja L_3.

Część frakcji L_1 i L_3 oraz całą frakcję L_2 pozostawiono do badań serologicznych. Większą część frakcji L_1 i L_3 rozpuszczono w eterze w chłodni i dodano równą objętość zimnego acetonu. Strąt, który powstał odwirowano, przemyto alkoholem i wysuszono uzyskując z frakcji L_1 fosfatyd F_{1a} w postaci masy brunatnej, konsystencji kruchej, zawieszalny w wodzie w postaci delikatnej, opalizującej emulsji; z frakcji L_3 otrzymano 3,5 g fosfatydu F_{2a}, bladobrązowego proszku, rozpuszczalnego w ciepłej wodzie.

Płyny pozostałe po wytrąceniu acetonem frakcji F_{1a} i F_{2a} przesączono przez bibułę i odparowano uzyskując około 3 g frakcji lipidowej L_{1b}: substancja brunatna, o konsystencji wosku, nie rozpuszczalna w wodzie, oraz minimalną ilość frakcji lipidowej L_{3b}: mazista substancja barwy brunatnej, nie rozpuszczalna w wodzie.

Poza wymienionymi frakcjami lipidowymi wyekstrahowano oddzielnie przygotowaną masę bakteryjną szczepu PW_8 benzenem i olejem parafinowym. Wyciąg benzenowy przesączono przez bibułę i zagęszczono destylując przy obniżonym

ciśnieniu, uzyskując około 1,5 ml półstałej brunatnej substancji — frakcja L_4. Część tej frakcji pozostawiono do badań serologicznych, resztę rozpuszczono w eterze i wytrącono równą objętością zimnego acetonu, uzyskując frakcję fosfatydową F_{3a}: blodopomarańczowy proszek, łatwo rozpuszczalny w wodzie. Z płynu pozostałego po oddzieleniu tej frakcji otrzymano po wysuszeniu małą ilość frakcji F_{3b}: półpłynna, bladobrunatna maź. Wyciąg parafinowy odwirowano w ciągu 3 godzin przy 6000 obrotach na minutę i po oddzieleniu od oleju parafinowego otrzymano około 2 ml półpłynnej szarobrunatnej substancji: frakcja lipidowa L_5.

Z powodu zbyt małych ilości poszczególnych frakcji lipidowych badania chemiczne trzeba było ograniczyć do oznaczenia azotu i fosforu w niektórych, więcej wydajnych frakcjach.

Po wyekstrahowaniu lipidów pozostałą masę bakteryjną szczepu PW_8 przewietrzono i częściowo przesuszono. Masę bakteryjną następnie wyekstrahowano w temperaturze pokojowej kolejno 5, 2 i 0,5-procentowym kwasem octowym zalewając bakterie 200 - 400 ml tych roztworów. Ekstrakcję każdym roztworem powtarzano dwukrotnie lub trzykrotnie po 2 - 3 dni. Wyciągi w 5, 2 i 0,5-procentowym roztworze kwasu octowego przesączano przez bibułę i przez sączek Seitza oraz zadano 3 - 4-krotnie większą objętością zimnego etanolu z dodatkiem 0,5% octanu sodowego.

W tych warunkach wypadał biały lub bladoszary osad kłaczkowaty, przyczepiający się do ścian cylindra szklanego lub opadający na dno. Po odlaniu alkoholu etylowego osad rozpuszczano w 20 - 30 ml wody destylowanej, przesączano przez sączek bibułowy i wytrącano ponownie alkoholem; zabieg ten zwykle powtarzano dwukrotnie. Odwirowany osad osuszano w cieplarce. Uzyskano w ten sposób trzy frakcje cukrowe „kwaśne" łatwo rozpuszczalne w wodzie: C_{1a} — bezpostaciowy, jasnobrunatny proszek (1,9 g), C_{1b} — bezpostaciowy, jasnokremowy proszek (3,4 g), C_{1c} bezpostaciowy, biały proszek (1,8 g).

Pozostałą masę bakteryjną zobojętniano 1/10 N NaOH, podsuszano i ekstrahowano 500 ml 0,05 N NaOH trzykrotnie, zmieniając roztwór co 3 - 4 dni. Wszystkie wyciągi (przejrzyste, barwy bladoseledynowej) złączono, przesączono przez bibułę i wkroplono 10-procentowego kwasu octowego do punktu izoelektrycznego (około *pH* 4,0 - 4,5), w którym wytrącił się dość skąpy osad. Płyn z nad osadu oddzielono i pozostawiono w chłodni; po pierwszym wytrąceniu frakcji N_1 przesączono go trzykrotnie przez bibułę i wytrącono trzykrotną objętością zimnego alkoholu etylowego z dodatkiem 1-procentowego octanu sodowego szarawy, śluzowaty osad, przylegający do ścianek cylindra. Osad odwirowano, rozpuszczono w 120 ml wody destylowanej, przesączono przez bibułę i ponownie wytrącono alkoholem. Oczyszczenie powtórzono jeszcze dwukrotnie, po ostatnim rozpuszczeniu przesączono przez filtr Seitza. Po wytrąceniu etanolem i wysuszeniu osadu otrzymano 2,3 g bezpostaciowego, brunatnego proszku, łatwo rozpuszczalnego w wodzie — frakcja C_2.

Masę bakteryjną pozostałą po oddzieleniu frakcji N_1 podsuszono i zmieszano z 500 ml 0,2 N NaOH, zmieniając płyn trzykrotnie co 2 - 3 dni. Dalsze postępowanie, jak w przypadku frakcji N_1. Uzyskano frakcję proteidową N_2 (2,68 g): bezpostaciowy, jasnobrunatny proszek.

Z płynu pozostawionego w chłodni po pierwszym wytrąceniu frakcji N_2, przesączonego 3 razy przez bibułę, wytrącono etanolem frakcję cukrową C_3, którą oczyszczono podobnie jak frakcję C_2. Uzyskano 1,1 g substancji szaro-blado-brunatnej w postaci wiórków, łatwo rozpuszczalną w wodzie.

Masę bakteryjną pozostałą po oddzieleniu frakcji N_2 podsuszono i zalano 500 ml 0,5-procentowego roztworu NaOH, zmieniając płyn trzykrotnie co 2 dni. Dalsze postępowanie jak z frakcją N_1 z tą różnicą, że z każdego wyciągu wytrącano proteid oddzielnie. Uzyskano frakcję proteidową N_3 (1.85 g): bladobrunatną, bezpostaciową substancję.

Z płynu pozostałego po pierwszym wytrąceniu frakcji N_3 z pierwszego ekstraktu NaOH wytrącono etanolem frakcje cukrowe C_{4a} oraz C_{4b} (po ekstrakcji drugiej i trzeciej). Dalsze oczyszczenie tych frakcji podobne jak w przypadku C_2. Po osuszeniu uzyskano ostatecznie C_{4a} — brunatną substancję w postaci wiórków, nierozpuszczalną w zimnej wodzie, w gorącej tworzącą opalizującą zawiesinę; C_{4b} o podobnych właściwościach jedynie bledszej barwie. Wydajność obu frakcji 1,85 g.

Masę bakteryjną pozostałą po oddzieleniu frakcji N_3 poddano działaniu 1-procentowego NaOH (500 ml). Dalsze postępowanie jak z frakcją N_1. Uzyskano 2 frakcje: N_{4a} (5,8 g) — bezpostaciowa, szaro-blado-brunatna, N_{4b} (7,5 g) — bezpostaciowa, bladokremowa.

Z połączonych płynów po pierwszym wytrąceniu frakcji N_{4a-b} wytrącono etanolem frakcję cukrową C_5, którą opracowano jak frakcję C_1. Otrzymano substancję wiórkowatą, barwy bladopomarańczowej (1,4 g).

W podobny sposób jak opisano poprzednio, opracowywano pozostałą masę bakteryjną, oddzielając kolejno frakcje proteidowe: N_5 (5,45 g) ekstrahowaną 2% NaOH, N_6 (14 g) ekstrahowaną 3,5% NaOH, N_7 (50,11 g) ekstrahowaną 5% NaOH; N_8 (300 g) ekstrahowaną 7% NaOH, oraz frakcje cukrowe, wytrącone etanolem z płynu po pierwszym wytrąceniu kolejnych frakcji proteidowych kwasem octowym: frakcje cukrowcowe C_6 (1,35 g), C_7 (2,55 g), C_{8a-b} (7,15), C_{9a-b} (0,7 g). Frakcje proteidowe dializowano względem bieżącej wody wodociągowej i destylowanej po 2 doby.

Masa pozostała po oddzieleniu tych frakcji miała postać szarobrunatnej, gęstej mazi. Podsuszono ją i hydrolizowano 15-procentowym ługiem sodowym w 90 - 100° przez 60 minut, co spowodowało upłynnienie masy. Uzyskano płyn o gęstości mleka, barwy ciemnobrunatnej z pływającymi w nim nierozpuszczalnymi, skąpymi resztkami masy bakteryjnej. Resztki te oddzielono przez sączenie, przemyto alkoholem i wysuszono. Otrzymano 1,7 g reszty bakteryjnej — frakcja *R*: substancja krucha, barwy żółtej, rozpuszczalna w gorącej wodzie.

Przesącz (płyn po hydrolizie 15-procentowym ługiem sodowym) zadano stężonym kwasem octowym aż do wytrącenia osadu kłaczkowatego, barwy brunatnej. Osad rozpuszczono 20-procentowym ługiem sodowym, odwirowano i wytrącono ponownie kwasem octowym, oczyszczanie powtórzono jeszcze raz. Wytrącona i wysuszona frakcja N_9 (8,9 g), białkowa, ciepłoodporna, miała postać bladobrunatnych łusek, lekko hygroskopijnych. Frakcję tę po rozpuszczeniu w ługu i zobojętnieniu rozcieńczono wodą destylowaną i dializowano względem wody bieżącej 3 doby; następnie wytrącono frakcję N_9 kwasem octowym.

Z płynu po pierwszym wytrąceniu frakcji N_9, po trzykrotnym przesączeniu wytrącono trzykrotną objętością alkoholu frakcję cukrową C_{10}, którą oczyszczono rozpuszczając w wodzie i wytrącając ponownie alkoholem etylowym. Uzyskano 6,2 g bezpostaciowego, białego proszku, łatwo rozpuszczalnego w wodzie.

Frakcje cukrowe C_{11} - C_{13} wyizolowano z fosfotydów F_{1a}, F_{2a} i F_{3a}, które poddano działaniu 4-procentowego kwasu octowego (100 - 400 ml) w temperaturze cieplarki w ciągu 5 dni. Wyciągi przesączono dwukrotnie przez bibułę i wytrącono trzykrotnie większą objętością zimnego etanolu w temperaturze —4° małe ilości frakcji cukrowych, które rozpuszczono w kilkunastu ml wody destylowanej, przesączono przez bibułę i wytrącono ponownie. Po wysuszeniu uzyskano frakcje C_{11}, C_{12} i C_{13} w postaci białych, bezpostaciowych proszków, łatwo rozpuszczalnych w wodzie. Wydajność: kilka mg w każdej frakcji.

Maczugowce rzekomo błonicze, szczep *124* frakcjonowano w sposób podobny jak maczugowce błonicy (schemat 2). Masę bakteryjną zamrażano i odtajano 20-krotnie, po czym ekstrahowano 10-krotnie większą ilością alkoholu-eteru (1 : 1) przez 5 dni w temperaturze pokojowej, zmieniając dwukrotnie rozpuszczalnik. Wyciągi złączono, przesączono przez bibułę i przez sączek Seitza, oraz zagęszczono destylując w temperaturze 70° przy obniżonym ciśnieniu. Uzyskano około 2 ml substancji o konsystencji wazeliny, barwy ciemnobrunatnej — frakcja L_1.

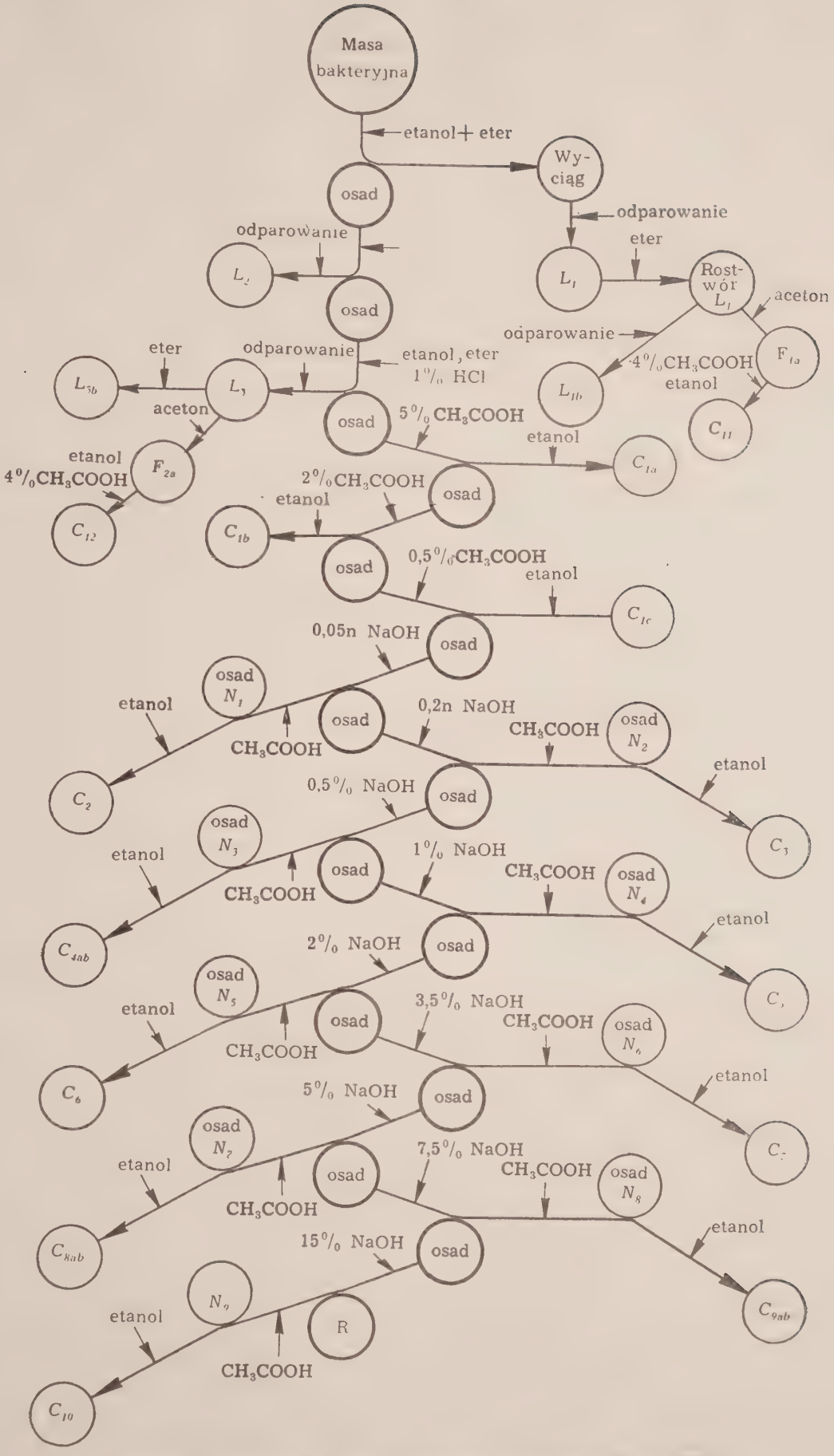
Pozostałą masę bakteryjną ekstrahowano alkoholo-eterem z 1% kwasu solnego. Dalsze opracowanie jak frakcji L_1. Otrzymano około 0,7 ml substancji o konsystencji wazeliny, barwy jasnobrunatnej — frakcja L_2.

Odtłuszczoną masę bakteryjną przewietrzono, wysuszono i ekstrahowano w temperaturze pokojowej kolejno 5, 2 i 0,5-procentowym kwasem octowym wlewając każdorazowo 100 ml tych roztworów. Poszczególne wyciągi złączono, przesączono przez bibułę i przez sączek Seitza, dolano trzykrotnie większej objętości zimnego alkoholu etylowego wytrącając osad szarawy, kłaczkowaty. Po odwirowaniu osad rozpuszczono w kilkunastu ml wody destylowanej i ponownie wytrącono alkoholem etylowym. Osad wysuszono w temperaturze 37°. Uzyskano w ten sposób 3 frakcje cukrowe: C_1-bezpostaciowy, kruchy, jasnobrunatny proszek, C_2-bezpostaciowy, brunatnoszary proszek, C_3-bezpostaciowy, bladoszary proszek.

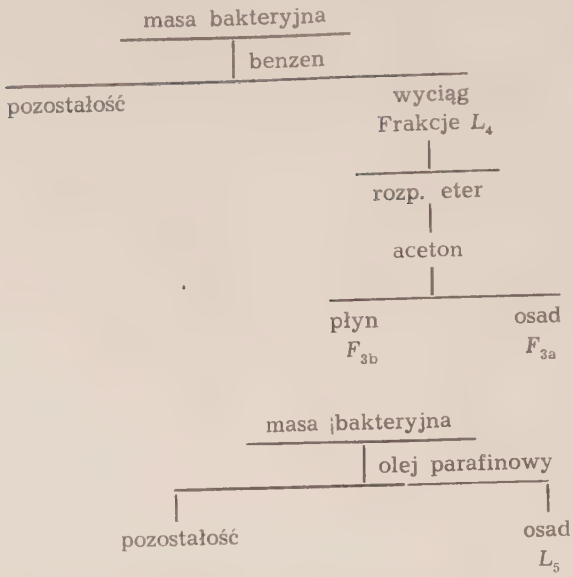
Wydajność frakcji bardzo mała (10 - 20 mg).

Pozostałą masę bakteryjną podsuszono i ekstrahowano 0,05 N NaOH w ciągu 10 dni; płyn oddzielono przez sączenie i próbowano osad wytrącić 10-procentowym kwasem octowym oraz siarczanem amonowym, lecz bezskutecznie; płyn nie zawierał białka wytrącalnego kwasem octowym, jak również siarczanem amonowym.

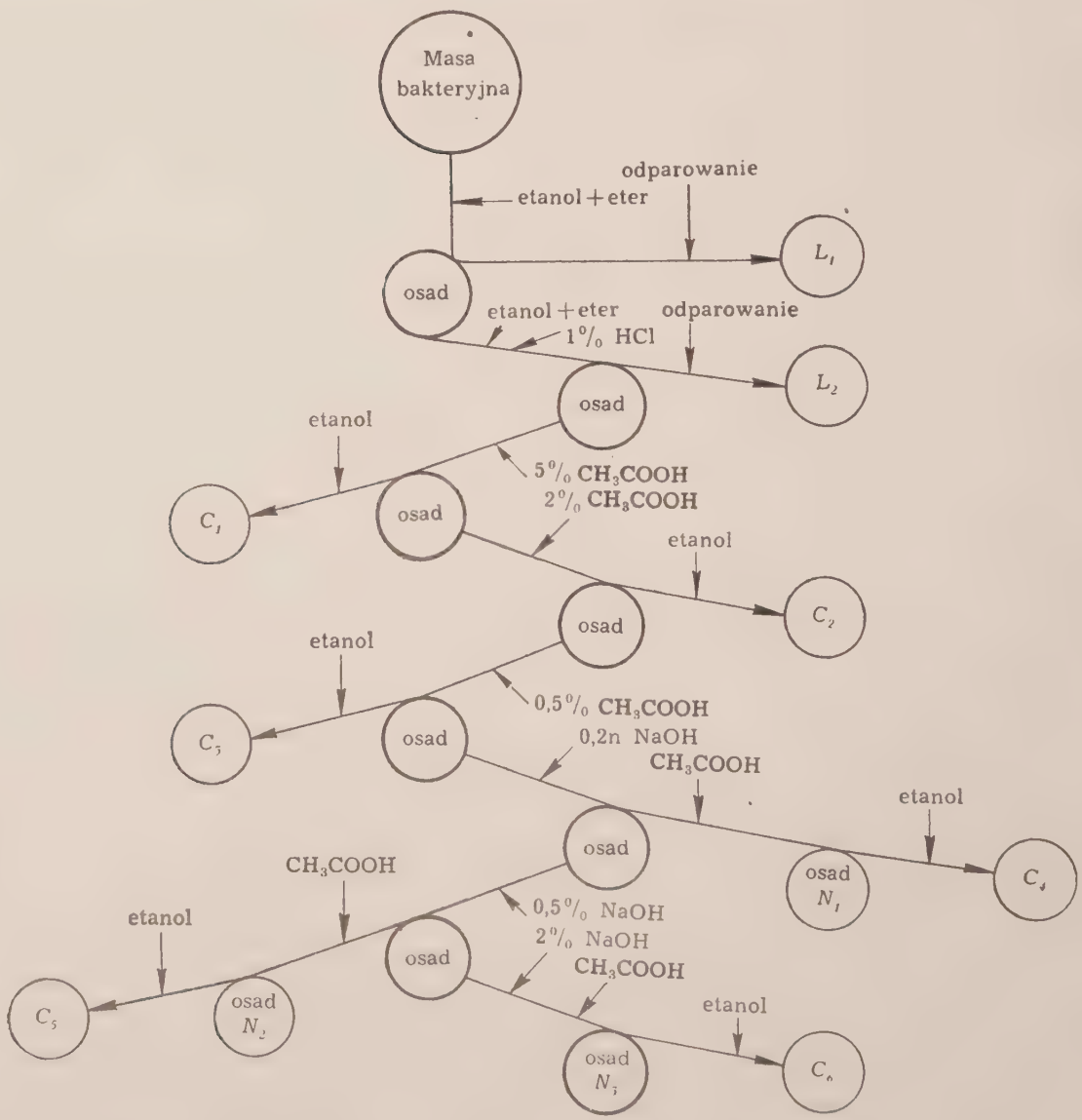
Dalszą ekstrakcję przeprowadzano 0,2 N NaOH, zmieniając ten roztwór trzykrotnie co 2 - 3 dni. Płyn przesączono przez bibułę i dolano kroplami 10-procento-



Schemat 1. Przygotowanie frakcji chemicznych maczugowców błonicy PW_8
Schema 1. Preparation of chemical fractions of *C. diphteriae* PW_8



Schemat 1a. Przygotowanie frakcji chemicznych maczugowców błonicy PW_8
Schema 1a. Preparation of chemical fractions of *C. diphteriae* PW_8



Schemat 2. Przygotowanie frakcji chemicznych maczugowców rzekomo błoniczych *Nr 124*
Schema 2. Preparation of chemical fractions of *C. hofmannii Nr 124*

wego kwasu octowego do punktu izoelektrycznego (*pH* około 4,5), w którym wytrącił się osad frakcji N_1. Osad ten rozpuszczono ługiem i ponownie wytrącono 10-procentowym kwasem octowym. Po wysuszeniu uzyskano 0,6 g substancji bezpostaciowej, barwy bladokremowej.

Z przesączu po pierwszym wytrąceniu frakcji N_1, po dwukrotnym przesączeniu, wytrącono trójkrotną objętością alkoholu etylowego ciągliwy, biały osad, który odwirowano i wysuszono. Otrzymano frakcję C_4: bezpostaciową, białą substancję.

W podobny sposób oddzielono frakcję proteidową N_2 z ekstraktu 0,5-procentowego NaOH i frakcję cukrowcową C_5, oraz frakcję proteidową N_3 z ekstraktu 2-procentowego NaOH i frakcję cukrowcową C_6. Przy ekstrahowaniu frakcji N_3 rozpuściła się całkowicie reszta materiału tak, że dalszych frakcji proteidowych jak i cukrowych nie otrzymano.

Frakcja N_2 była to bladokremowa, bezpostaciowa substancja, frakcja N_3 — biała, bezpostaciowa, frakcja C_5 — biała, bezpostaciowa, frakcja C_6 — bladokremowa, bezpostaciowa substancja. Wszystkie frakcje cukrowe były dobrze rozpuszczalne w zimnej wodzie.

BADANIE SKŁADU CHEMICZNEGO FRAKCJI MACZUGOWCÓW

We frakcjach proteidowych oznaczono procentową zawartość azotu, fosforu, białka oraz (po 6-godzinnej hydrolizie w 1 N HCl) substancji redukujących, rybozy i dezoksyrybozy. W frakcjach cukrowych określono po 6-godzinnej hydrolizie w 1 N HCl: procent azotu, fosforu, substancji redukujących, glikozaminy oraz po hydrolizie w 1 N H_2SO_4 — rodzaj cukrów prostych. W frakcjach fosfatydowych, z powodu małej ilości materiału przeznaczonego do badań chemicznych, oznaczono tylko azot i fosfor. Azot oznaczono metodą Kjeldahla według Parnasa-Wagnera, fosfor według metody Briggsa, białko metodą Folina-Ciocalteau, substancje redukujące według Nelson, rybozę według metody orcynolowej Barrenscheena, dezoksyrybozę metodą dwufenyloaminową Dieschego, glukozaminę według metody Morgan-Elsona, rodzaj cukrów prostych metodą chromatografii bibułowej.

WYNIKI

Wyniki badań chemicznych zestawiono w tabelach I - II oraz na wykresach 1 - 4.

Według przeprowadzonych badań zawartość głównych ciał chemicznych w suchej masie maczugowców błonicy szczepu PW_8 wyraża się następującymi odsetkami: *

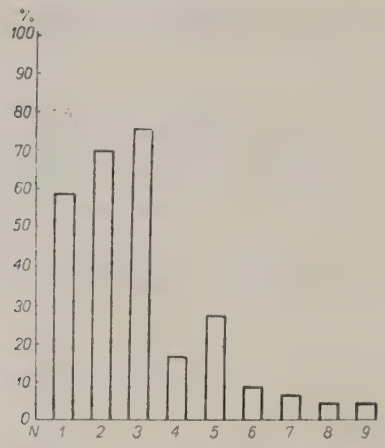
proteidy — 84%
lipidy — 9%
cukry — 7%.

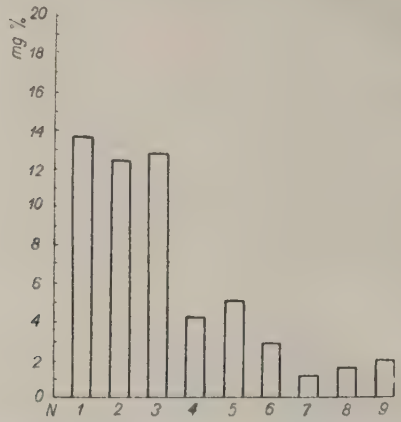
Frakcje proteidowe maczugowców błonicy są to bezpostaciowe proszki, o różnym odcieniu barwy żółtej: od białokremowej do żółtobrunatnej, rozpuszczające się łatwo w 1/10 N NaOH i tworzące w rozcieńczeniu 1 : 100 przejrzyste lub słabo opalizujące płyny.

Zawartość azotu, fosforu, białka, substancji redukujących i rybozy wahała się dość znacznie w poszczególnych frakcjach.

Poziomy azotu i białka (wykresy 1 - 2) w poszczególnych frakcjach proteidowych pokrywają się dość dokładnie. Wysokie wartości białka i azotu stwierdza się w początkowych trzech frakcjach nukleoproteidowych, a kilkakrotnie niższe — w następnych frakcjach. Najwyższe stężenie fosforu (rysunek 3) przypada na frakcje N_3 i N_4, w pozostałych frakcjach poziom fosforu jest kilkakrotnie niższy. Frakcja ostatnia (N_9) pod względem zawartości fosforu zajmuje miejsce pośrednie.

* Odsetki te podane są w przybliżeniu, ze względu na to, że pewna część poszczególnych frakcji pozostawała na sączkach, a niektóre frakcje chemiczne zawierały zapewne związki chemiczne użyte do preparatyki maczugowców.



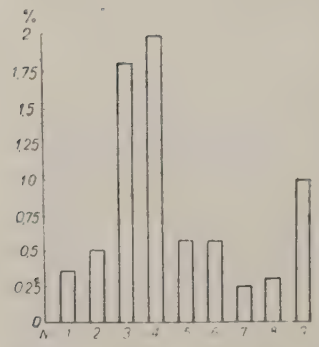


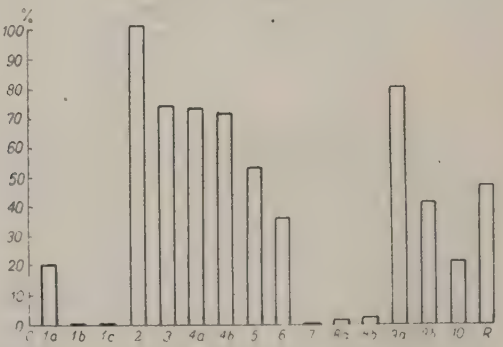
Rys. 1. Poziom białka (met. Folina) we frakcjach proteinowych PW_8 (% w stosunku do suchej masy frakcji).

Rys. 2. Poziom azotu (metoda Kjeldahla) we frakcjach proteidowych PW_8.

Fig. 1. Amount of proteins (per cent of dry weight) in proteide fractions of *C. diphteriae* PW 8 (Folin's method)

Fig. 2. Nitrogen contents of proteide fractions of *C. diphteriae* PW_8 (Kjeldahl's method)





Rys. 3. Poziom fosforu we frakcjach proteidowych szczepu PW_8 (procentowy stosunek do wagi frakcji).

Rys. 4. Poziom substancji redukujących we frakcjach cukrowych PW_8.

Fig. 3. Phosphorus contents of proteide fraction of *C. diphteriae* PW_8 (per cent of dry weight)

Fig. 4. Amount of reducing substances in polysaccharide fractions of *C. diphteriae* PW_8

Ślady dezoksyrybozy wykryto tylko w dwu frakcjach proteidowych: N_2 i N_3. Substancje redukujące i rybozę znaleziono zasadniczo tylko w czterech początkowych frakcjach proteidowych (dodatkowo jeszcze małą ilość we frakcji N_7). Przypuszczalnie tylko część frakcji proteidowych (N_1, N_5, N_6) ma charakter nukleoproteidowy. Pozostałe frakcje zawierały tylko niewielki odsetek białek.

TABELA I

Właściwości fizyko-chemiczne frakcji proteidowych maczugowców błonicy PW_8 i maczugowców rzekomo błoniczych *Nr 124*

The physico-chemical properties of proteide fractions of *C. diphteriae* PW_8 and *C. hofmannii Nr 124*

Nr frakcji Fractions	Wydajność Yield	Zawartość (% w stosunku do suchej masy frakcji) Per cent in the dry mass of fraction					
		N	P	białka protein	substancje redukujące reducing substances	ryboza	dezoksyryboza
C. diphteriae PW_8							
N_1	0,6	13,65	0,32	57,5	4,8	2,96	—
N_2	2,68	9,41	0,50	69,0	4,0	3,24	ślad
N_3	1,85	12,32	1,76	74,25	6,0	4,08	ślad
N_4	13,3	4,13	1,93	13,50	0,4	2,5	—
N_5	5.45	4,88	0,54	27,50	0	1,0	—
N_6	14,0	6,3	0,54	99,5	0	0,4	—
N_7	50,11	1,27	0,22	8,0	0,4	0,4	—
N_8	300,00	1,28	0,28	3,5	0	1,44	—
N_9	8,9	1,53	1,01	3,5	0	0,88	—
C. hofmanni Nr 124							
N_1	.	2,26	0,12	20,8	5,2	5,0	ślad
N_2	.	1,55	0,07	51,0	0,32	2,4	—
N_3	.	0,47	0,0	6,5	0,8	0,96	—

Poziomy azotu i białka w poszczególnych frakcjach proteidowych maczugowców rzekomo błoniczych zmieniają się podobnie jak w frakcjach maczugowców błoniczych szczepu PW_8. Wykresów dla tych frakcji nie przedstawiam i nie analizuję, gdyż oddzielono tylko trzy frakcje proteidowe maczugowców rzekomo błoniczych.

Większość frakcji cukrowych była łatwo rozpuszczalna w zimnej wodzie destylowanej, niektóre (C_{1a}, C_{1b}, C_{9a}) rozpuszczały się dopiero po zagotowaniu; frakcje te, znajdujące się w większym stężeniu np. 1 : 5—1 : 100, tworzyły opalizujące roztwory.

TABELA II

Właściwości fizyko-chemiczne frakcji cukrowych maczugowców błonicy PW_8
Physico-chemical properties of polysaccharide fractions of *C. diphteriae* PW_8

Nr frakcji Fraction	Wydajność Yield	Zawartość (%) w stosunku do suchej masy frakcji) Per cent in the dry mass of fraction				
		N	P	substancji redukujących reducing substances	glikozaminy	Cukry proste (chromatograficznie) monosaccharides
C_{1a}	1,9	0	0,16	19,3	0	arabinoza
C_{1b}	3,4	2,95	0,22	0	0	arabinoza, mannoza, glikoza, galaktoza
C_{1c}	1,8	3,05	0,22	0	0	arabinoza, mannoza, glikoza, galaktoza
C_2	2,3	1,61	0,12	100	1,2	glikoza, galaktoza, mannoza, arabinoza, kwas uronowy, glikozamina
C_3	1,1	4,44	0,12	73	2,0	glikozamina, mannoza, arabinoza, glikoza, galaktoza
C_{4a}	0,85	1,61	0	71,2	—	—
C_{4b}	1,0	2,5	0	70,0	0,4	arabinoza, glikozamina, glikoza, galaktoza
C_5	1,4	4,03	0,10	52,8	0,4	arabinoza, glikozamina, glikoza, galaktoza
C_6	1,35	—	0	31,6	0	arabinoza
C_7	2,55	2,5	0	1,5	0,2	arabinoza
C_{8a}	4,5	0	0	1,6	0,2	arabinoza, glikozamina, glikoza, galaktoza
C_{8b}	2,65	0,58	0	1,6	0,2	arabinoza, glikozamina, glikoza, galaktoza
C_{9a}	0,35	1,69	0	77,2	0	arabinoza
C_{9b}	0,35	1,85	0	40,6	0	arabinoza, mannoza, glikoza, galaktoza
C_{10}	6,2	0	0	23,7	5,6	arabinoza, mannoza, glikozamina, kwas uronowy, glikoza, galaktoza
R	1,7	3,14	0,10	48,8	1,4	arabinoza, glikoza, galaktoza, mannoza, glikozamina

Wszystkie frakcje z wyjątkiem C_{1a}, C_{1b}, C_{9a} i R rozpuszczalne w zimnej wodzie.
All fractions with exception of C_{1a}, C_{1b}, C_{9a} and R soluble in cold water.

Frakcje cukrowe wyekstrahowane roztworami kwasu octowego cechują się brakiem lub stosunkowo małą zawartością substancji redukujących. Wśród frakcji cukrowych, uzyskanych z wyciągów NaOH po oddzieleniu odnośnych frakcji proteidowych, stężenie substancji redukujących jest wysokie w początkowych frakcjach tego typu i spada dość prędko do minimalnego poziomu (około 1,5%) w frakcjach przedostatnich C_7 - C_8. Dopiero po oddzieleniu frakcji N_9 i następnych, wyciąganych stosunkowo stężonym roztworem ługu sodowego, udaje się uwolnić substancje redukujące związane prawdopodobnie silnie z tą frakcją proteidową. Dalsze frakcje, tj. C_{9a-b} zawierają stosunkowo znaczny odsetek substancji redukujących. Na wykresie 4, obrazującym stężenie substancji redukujących we frakcjach „zasadowych", spostrzegamy przeto dwa szczyty (przy C_2 i C_{9a}), opadające w następujących po nich frakcjach.

W frakcjach cukrowych maczugowców błonicy zidentyfikowano metodą chromatograficzną następujące cukry lub związki pokrewne: arabinoza, galaktoza, glikoza, mannoza, glikozamina i kwas uronowy. Rozpoznanie chromatograficzne glikozaminy w frakcjach cukrowych pokrywa się z ilościowym oznaczeniem (według metody Morgan-Elsona) tej substancji w danych frakcjach. Zawartość glikozaminy waha się ogólnie w granicach 0,2 - 2%; większe stężenie (5,6%) zawiera jedynie ostatnia frakcja C_{10}.

Frakcja *R* jest prawdopodobnie sympleksem cukrowca z ciepłoopornym białkiem; być może, że jest to glikoproteid. Około połowę wagi suchej frakcji *R* tworzą substancje redukujące; poza tym zawiera ona dość dużo azotu (3,14%) oraz fosfor. Metodą chromatograficzną w hydrolizacie frakcji *R* wykryto arabinozę, mannozę, glikozaminę oraz glikozę lub galaktozę.

Frakcje cukrowe wyosobnione z fosfatydów są substancjami bezpostaciowymi, barwy białej, łatwo rozpuszczalnymi w wodzie, dają dodatni odczyn Molischa. Wydajność tych frakcji wynosiła 2 - 5 mg.

Poziom azotu i fosforu w frakcjach fosfatydowych maczugowców błonicy F_{1a} i F_{2a}

Nr frakcji	% azotu	% fosforu	Odczyn Molischa
F_{1a}	0,35	0,62	+
F_{2a}	0,45	0,54	+

Frakcje lipidowe maczugowców błonicy, jak wspomniano, nie były badane szczegółowo pod względem chemicznym z powodu małej ilości uzyskanego materiału oraz z uwagi na systematyczne zbadanie lipidów maczugowców błonicy, wykonane głównie przez zespół Gubariewa. Właściwości fizyczne naszych frakcji lipidowych oraz stężenie azotu i fosforu w frakcjach fosfatydowych (co obrazuje podana tabelka) nie odbiegły od obserwacji dokonanych w badaniach innych autorów, omówionych w I części tej pracy.

Z frakcjami fosfatydowymi związane są cukry, które wyizolowano po ekstrahowaniu 4-procentowym kwasem octowym w temperaturze 6°. Uzyskano frakcje C_{11}, C_{12} i C_{13}.

BADANIA SEROLOGICZNE

Aktywność wszystkich frakcji maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych zbadano w odczynie wiązania dopełniacza.

TABELA III

Miano wiązania dopełniacza (surowicy przeciw szczepowi PW_8): rozcieńczenia frakcji w tysiącach

The antigenic characteristics of various fractions of *C. diphteriae* PW_8 and *C. hofmannii 124*. Complement fixation test.
Serum anti-*C. diphteriae* PW_8. (Titre in thousands)

Frakcja Fraction	Surowice odpornościowe Serum anti-*C. diphteriae*		
	nieabsorbowane unadsorbed	absorbowane *124* adsorbed with *124*	absorbowane toksyną adsorbed with the toxin
	C. diphteriae PW_8		
C_{1a}	16 - 125	0	16
C_{1b}	0 - 16	0	16
C_{1c}	16 - 64	32	16
C_2, C_{4b}	125 - 500	0	500
C_3, C_6	125 - 500	0	250
C_{4a}	125 - 250	0	500
C_5	125 - 1000	0	500
C_7	8 - 125	0	64
C_{8a}	0 - 125	0	32
C_{8b}	2 - 125	0	32
C_{9a}	32 - 500	0	125
C_{9b}	125 - 1000	0	500
C_{10}	0	0	0
C_{11}	32	0	0
C_{12}	32	32	0
C_{13}	16	16	16
N_1	16 - 32	0	8
N_2	64 - 250	0	125
N_3	4 - 64	0	64
N_{4a}	8 - 64	0	32
N_{4b}	16 - 250	0	64
N_5	4 - 500	16	64
N_6, R	0	0	0
N_7	4 - 32	0	4
N_8	4 - 16	0	8
N_9	64 - 250	8	32
L_1	500 - 1000	0	0
F_{1a}, F_{2a}	8	0	0
F_{1b}	32	32	0
F_2, L_2	0 - 2	0	0
F_{2b}	64	0	0
L_3	16 - 250	8 - 32	0
F_{3a}	2	0	0
F_{3b}	0	0	0
L_4	64 - 250	0	0
L_5	8 - 32	2 - 4	16
Toksyna i toksoid	64	0	0

Frakcja Fraction	Surowice odpornościowe Serum anti-C. *diphteriae*		
	nieabsorbowane unadsorbed	absorbowane *124* adsorbed with *124*	absorbowane toksyną adsorbed with the toxin
	C. hofmannii 124		
C_1	4	0	0
C_2	0	0	0
C_3	32	0	0
C_4	125	0	0
C_5	4	0	0
N_1	16	32	0
N_2	64	0	0
N_3	16	32	0
L_1	125	0	0
L_2	16	0	0

Surowica absorbowana szczepem PW_8 reagowała jedynie z frakcją C_5-*C diphteriae* w mianie 1 : 16 000.

Serum adsorbed with the strain PW_8 gave positive test only with fraction C_5 of *C. diphteriae* in titer 1 : 16 000.

Antygeny cukrowcowe rozpuszczono w roztworze 0,85-procentowego NaCl w rozcieńczeniu 1 : 1000; (niektóre antygeny rozpuszczały się dopiero po zagotowaniu). Antygeny proteidowe rozpuszczono w 0,5 - 1,0 ml 1/10 N NaOH, zobojętniono 1/10 N HCl oraz dopełniono roztworem fizjologicznym do rozcieńczenia 1 : 1000. Antygeny lipidowe ucierano w roztworze fizjologicznym uzyskując przeważnie koloidalną lekko opalizującą zawiesinę.

Przy nastawianiu odczynu poszczególne antygeny rozcieńczono w objętości 0,25 ml w postępie geometrycznym od 1 : 2000 lub 1 : 1000 do 1 : 1 000 000, dolewano po 0,25 ml surowicy odpornościowej królików w stałej dawce, wynikającej z uprzedniego miareczkowania, oraz po 0,25 ml dopełniacza rozcieńczonego według określonego przedtem miana, używając podwójną dawkę hemolityczną. Po inkubacji w łaźni wodnej w 37° przez 45 minut wlewano po 0.5 ml 3% krwinek baranich uczulonych amboceptorem hemolitycznym królika i inkubowano w 37° w łaźni do chwili hemolizy w probówkach kontrolnych (szereg kontrolny z rozcieńczeniami antygenu bez surowicy odpornościowej, surowica bez antygenu oraz kontrola układu hemolitycznego).

Wszystkie antygeny maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych badano w stosunku do następujących surowic odpornościowych króliczych:

przeciw maczugowcom błonicy, przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym i przeciw toksoidowi - toksynie;

oraz względem surowic odpornościowych absorbowanych: szczepem PW_8, szczepem *124*, toksoidem i toksyną;

surowicy przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym wyabsorbowanej: szczepem homologicznym, szczepem PW_8, toksoidem i toksyną;

surowicy antytoksycznej króliczej wyabsorbowanej: szczepem PW_8, szczepem *124*, toksoidem i toksyną.

Wszystkie odczyny serologiczne powtarzano używając 2 - 3 surowic każdego typu pochodzących od 2 - 3 uodpornionych królików. Wyniki zestawiono w tabelach III - V.

Frakcje cukrowe maczugowców błonicy (szczepu PW_8) na ogół są aktywne w surowicy homologicznej, z wyjątkiem frakcji końcowych C_{10} i sympleksu *R*. Aktywność frakcji „zasadowych" jest stosunkowo wysoka, waha się przeważnie w granicach miana 250 000 - 1 000 000. Frakcje wyciągane kwasem octowym (C_{1a}, C_{1b}, C_{1c}) są natomiast mniej czynne; słabe są frakcje cukrowe otrzymane z fosfatydów.

W surowicy heterologicznej — surowicy przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym (szczep *124*), aktywne są głównie frakcje C_2 - C_6, tj. początkowe frakcje „zasadowe", ale w mianie stosunkowo niższym niż w surowicy homologicznej. Dalsze frakcje „zasadowe" C_7 - C_{10} i *R* są w surowicy przeciw szczepowi maczugowców rzekomo błoniczych nieaktywne lub słabo aktywne, podobnie jak frakcje „kwaśne" i frakcje cukrów uzyskanych z fosfatydów.

Z surowicą antytoksyczną reagują tylko nieliczne frakcje cukrowe; dość dużą aktywność wykazuje frakcja C_5, mniejszą frakcje C_2, C_{11} i C_{12}, małą C_7 i C_{1b}.

Po absorpcji surowicy anty-PW_8 szczepem maczugowców rzekomo błoniczych reagują z nią tylko frakcje C_{1b} - C_5 i to w mianie 2 - 5-krotnie niższym niż z surowicą nieabsorbowaną; nie reagują frakcje C_{1a} oraz C_6 - C_{11}.

Absorpcja surowicy PW_8 toksyną (toksoidem) zasadniczo nie wpływa na miano (w porównaniu z mianem frakcji cukrowych w surowicy nie absorbowanej). Absorbowanie surowicy antytoksycznej szczepem PW_8 usuwa z niej przeciwciała dla cukrów maczugowców błonicy. Surowica absorbowana szczepem *124* traci całkowicie lub prawie całkowicie przeciwciała dla frakcji C_{1b}, C_2, C_3, C_5 i C_7.

Po absorpcji surowicy przeciw szczepowi maczugowców rzekomo błoniczych *124* toksyną (toksoidem) surowica ta nie reaguje z frakcjami C_{1b} i C_{1c}; miano surowicy dla niektórych innych frakcji cukrowych ulega obniżeniu.

Frakcje proteidowe maczugowców błonicy — wszystkie z wyjątkiem N_6 — są aktywne w surowicy homologicznej, lecz na ogół słabiej niż frakcje cukrowe.

W surowicy heterologicznej anty-*124* aktywne są głównie frakcje początkowe N_1 - N_4, będąc jednak 2 - 4-krotnie mniej czynne niż w surowicy homologicznej. Frakcje N_5, N_7 i N_8 są słabo aktywne, a N_6 i N_9 są nieczynne.

W surowicy antytoksycznej są słabo aktywne również tylko początkowe trzy frakcje.

Surowica PW_8 po absorpcji szczepem *124* reaguje słabo tylko z frakcjami N_5 i N_9. Po absorpcji surowicy *124* szczepem PW_8 minimalną aktywność wykazują tylko frakcje N_{4b} i N_7.

Po absorpcji surowicy PW_8 toksyną (toksoidem) aktywność poszczególnych frakcji w tej surowicy nieco obniża się. Po absorpcji surowicy

TABELA IV

Miano wiązania dopełniacza (surowica odpornościowa przeciw szczepowi *C. hofmannii 124* — rozcieńczenie frakcji w tysiącach)
The antigenic characteristics of various fractions of *C. diphteriae* PW_8 and *C. hofmannii 124*. Complement fixation test. Serum anti-*C. hofmannii 124* (Titre in thousands)

Frakcje Fractions	Surowice odpornościowe Serum		
	nieabsorbowane unadsorbed	absorbowane *124* adsorbed with *124*	absorbowane toksyną adsorbed with the toxin
	C. diphteriae PW_8		
C_{1a}	0	0	0
C_{1b}	0 - 64	0	0
C_{1c}	2 - 8	0	0
C_2	8 - 64	0	8
C_3	8 - 125	0	8
C_{4a}	4 - 250	0	16
C_{4b}	2 - 500	0	16
C_5	16 - 32	16	32
C_6	125 - 250	0	32
C_7	0 - 8	0	4
C_{8a}, C_{9b}, C_{10}	0	0	0
C_{8b}	0 - 2	0	0
C_{11}	4	0	0
C_{12}	64	32	0
C_{13}	8	0	0
N_1	2 - 16	2 nkp	0
N_2	4 - 8	0	0
N_3	4 - 16	0	0
N_{4a}	16 - 32	0	0
N_{4b}	0 - 32	0	0
N_5	0 - 4	0	0
N_6, N_9, R	0	0	0
N_7	2 - 4	0	0
N_8	0 - 4	2 nkp	0
L_1	16 - 32	8	16
F_{1a}, F_{1b}, F_{3b}	0	0	0
L_2, F_{3a}	2	0	0
F_{2a}	2 nkp	0	0
F_{2b}	2 nkp	0	0
L_3	8 - 32	0	0
L_4	8	0	0
L_5	8 - 16	0	0
Toksyna i toksoid	0	0	0
	C. hofmannii 124		
C_1	125	0	32
C_2	8	0	32
C_3	125	0	64
C_4	250	0	0
C_5	16	0	0
N_1	125	0	64
N_2	32	0	32
N_3	16	0	16
L_1	64	0	125
L_2	4	0	0

TABELA V

Miano wiązania dopełniacza (surowice odpornościowe przeciwtoksyczne królicze — rozcieńczenie w tysiącach)

The antigenic characteristics of various fractions of *C. diphteriae* PW_8 and *C. hofmannii 124*. Complement fixation test. Serum antitoxic (Titre in thousands)

Frakcje Fractions	miano w tysiącach Titre in thousands	Frakcje Fractions	miano w tysiącach Titre in thousands
C. diphteriae		*C. hofmannii*	
C_{1a}, C_{1c}, C_{4a}, C_{4b},	0	C_1, C_2, C_3, C_4	0
C_6, C_{8a}, C_{8b}, C_{9a},		C_5	0 - 8
C_{9b}, C_{10}, C_{13}		N_1, N_2	0
C_{1b}	0 - 8	N_3	2 - 8
C_2	4 - 64	L_1	4
C_3	0 - 8	L_2	8
C_5	16 - 250		
C_7	4 - 16		
C_{11}	32		
C_{12}	64		
N_1	0 - 4		
N_2	0 - 16		
N_3	4 - 16		
N_{4a}, N_{4b}, N_5, N_6, N_7	0		
N_9, R			
N_8	2 nkp		
L_1	0 - 32		
F_{1a}, L_2, F_{3b}	0		
F_{1b}	64		
F_{2a}, F_{2b}, F_{3a}	4		
L_3	32 - 64		
L_4	16		
L_5	8 - 16		
Toksyna i toksoid	500 - 1000		

Surowica absorbowana szczepem PW_8 reagowała jedynie z frakcjami: C_2 i C_{12} (miano 1 : 2000), C_5 i L_3 (miano 1 : 8000).

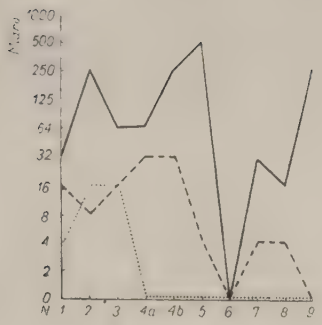
Surowica absorbowana szczepem *124* reagowała jedynie z frakcją C_2 (miano 1 : 2000) i L_3 (miano 1 : 16 000).

Surowica absorbowana toksyną reagowała jedynie z frakcją C_2 (miano 1 : 4000), z toksyną (miano 1 : 4000) i toksoidem (miano 1 : 8000).

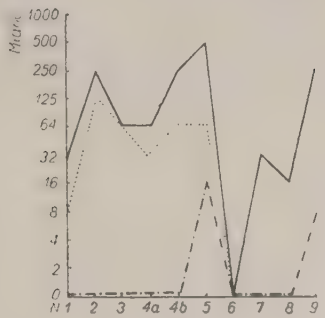
Serum adsorbed with strain PW_8 gave positive reaction only with fractions: C_2, C_{12}, C_5 and L_3 in the titres respectively: 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000.

adsorbed with strain *124* gave positive reaction only with fractions: C_2 (titre 1 : 2000) and L_3 (1 : 16 000),

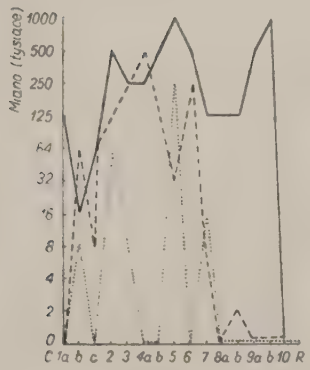
adsorbed with toxin gave positive reaction with fraction C_3 (1 : 4000), toxin (1 : 4000) and toxoid (1 : 8000).



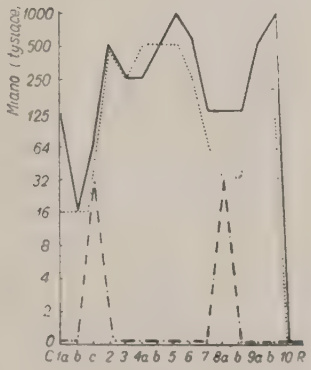
Rys. 5a



Rys. 5b



Rys. 6



Rys. 7

Rys. 5a—14. Aktywność różnych frakcji w reakcjach serologicznych.
Fig. 5a—14. Serological reactions of various fractions isolated from the cells of *C. diphteriae* PW_8 and of strain *124*.

———— w surowicy anty PW_8, in serum anti-PW_8

– – – – w surowicy anty *124*, in serum anti-*124*

w surowicy antytoksycznej, in serum antitoxic,

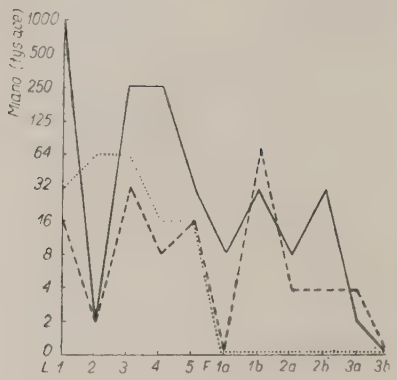
– · – · – w surowicy anty PW_8 absorbowanej szczepem *124*
in serum anti-PW_8 adsorbed with strain *124*

〰〰 w surowicy anty *124* absorbowanej szczepem PW_8
in serum anti-*124* adsorbed with strain PW_8.

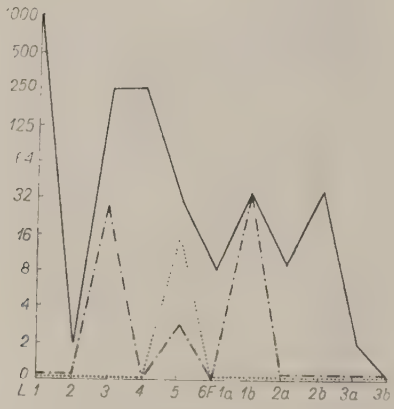
Rys. 5a. Frakcje proteidowe PW_8, Proteide fractions of strain PW_8.
Rys. 5b. Frakcje proteidowe PW_8, Proteide fractions of strain PW_8.
Rys. 6. Frakcje cukrowe, PW_8, Polysaccharide fractions of strain PW_8.
Rys. 7. Frakcje cukrowe, PW_8, Polysaccharide fractions of strain PW_8.

antytoksycznej szczepem PW_8 zanika aktywność tej surowicy w stosunku do wszystkich frakcji z wyjątkiem N_2.

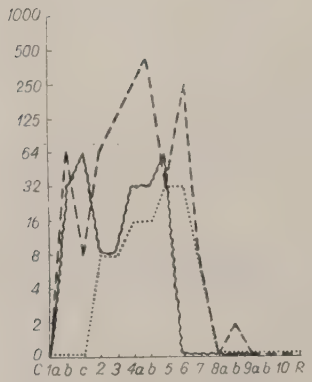
Surowica przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym absorbowana toksyną (toksoidem) nie reaguje z frakcjami proteidowymi maczugowców błoniczych. Po absorpcji surowicy antytoksycznej szczepem *124* ustępuje



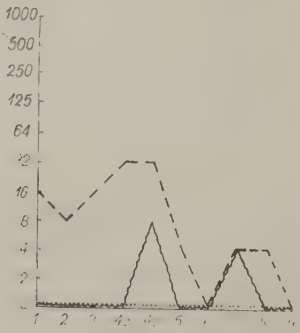
Rys. 8



Rys. 9



Rys. 10

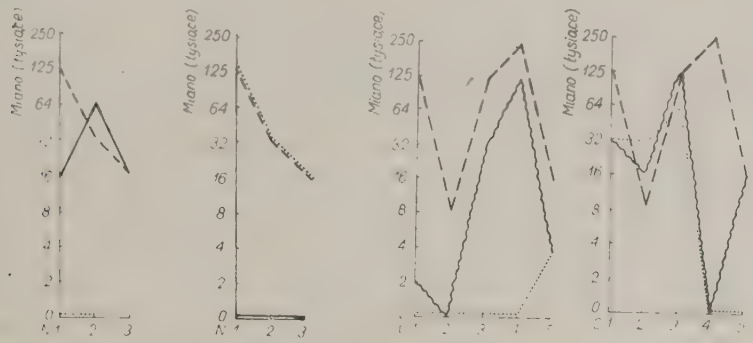


Rys. 11

Rys. 8. Frakcje lipidowe *PW 8*, Lipidic fractions of strain *PW 8*.
Rys. 9. Frakcje lipidowe *PW 8*, Lipidic fractions of strain *PW 8*.
Rys. 10. Frakcje cukrowe *PW 8*, Polysaccharide fractions of strain *PW 8*.
Rys. 11. Frakcje proteidowe *PW 8*, Proteide fractions of strain *PW8*.
Objaśnienia — patrz str. 339. For explanations — see p. 339.

aktywność tej surowicy wobec frakcji proteidowych maczugowców błonicy N_1 i N_3, z którymi reagowała surowica antytoksyczna przed absorpcją.

Frakcje lipidowe. Surowica PW_8 oddziaływuje silnie z frakcjami L_1, L_3, L_4, słabo z frakcją L_5 i L_2 oraz z frakcjami fosfatydowymi; frakcja F_{3b} jest w ogóle serologicznie nieczynna.



Rys. 12a Rys. 12b Rys. 13 Rys. 14

Rys. 12a. Frakcje proteidowe *124*, Proteide fractions of strain *124*.
Rys. 12b. Frakcje proteidowe *124*, Proteide fractions of strain *124*.
Rys. 13. Frakcje cukrowe *124*, Polysaccharide fractions of strain *124*.
Rys. 14. Frakcje cukrowe *124*, Polysaccharide fractions of strain *124*.
Objaśnienia — patrz str. 339. For explanations — see p. 339.

Surowica przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym reaguje słabo z frakcjami lipidowymi maczugowców błonicy, głównie z L_1, L_3 i L_5.

Surowica antytoksyczna reaguje słabo z frakcjami lipidowymi, głównie z L_1, L_3, L_4, L_5, bardzo słabo z frakcjami fosfatydowymi F_{2a}, F_{2b} i F_{3a}. Po absorpcji surowicy PW_8 szczepem *124* zanika aktywność tej surowicy w stosunku do większości frakcji lipidowych (L_1, L_3, L_4, F_{1a}, F_{2a-b}, F_3), utrzymuje się aktywność dla F_{1b}, L_3 i L_5.

Po absorpcji surowicy anty-*124* szczepem PW_8 znika aktywność tej surowicy dla wszystkich frakcji lipidowych, z którymi reaguje surowica anty-*124* nieabsorbowana (L_1, L_3, L_5).

Absorbowanie surowicy PW_8 toksyną (toksoidem) usuwa z niej przeciwciała dla wszystkich frakcji lipidowych z wyjątkiem L_5.

Absorbowanie surowicy antytoksycznej szczepem PW_8 usuwa z niej przeciwciała dla wszystkich frakcji lipidowych z wyjątkiem L_3.

FRAKCJE MACZUGOWCÓW RZEKOMO BŁONICZYCH (SZCZEP *124*)

Frakcje cukrowe reagują z homologiczną surowicą odpornościową w wyższym mianie niż z surowicą heterologiczną anty-PW_8. (Frakcja C_6 jest serologicznie nieczynna).

Z surowicą PW_8 oddziaływają tylko frakcje cukrowe C_3 - C_5. Frakcje cukrowe maczugowców rzekomo błoniczych zasadniczo nie reagują z surowicą antytoksyczną.

Absorpcja surowicy PW_8 szczepem *124* usuwa z niej przeciwciała wiążące frakcje C_3 - C_5. Absorbowanie surowicy *124* szczepem PW_8 usuwa przeciwciała jedynie dla frakcji C_1, pozostawiając przeciwciała wiążące inne frakcje cukrowcowe. Po absorpcji toksyną (toksoidem) surowica PW_8 przestaje reagować z frakcją C_3 - C_5 maczugowców rzekomo błoniczych. Absorbowanie toksyną surowicy *124* usuwa z niej przeciwciała wiążące C_4 - C_5, a pozostawia przeciwciała dla C_1 - C_3.

Wszystkie frakcje proteidowe maczugowców rzekomo błoniczych reagują z surowicą homologiczną, jednak w średnim mianie (1 : 16 000 — 1 : 125 000), a słabiej z surowicą anty-PW_8 (1 : 2000 — 1 : 64 000); z surowicą antytoksyczną reaguje tylko frakcja N_3. Absorpcja surowicy anty-PW_8 szczepem *124* usuwa z niej przeciwciała dla N_2, a pozostawia przeciwciała dla N_1 i N_3. Absorpcja surowicy anty-*124* szczepem PW_8 usuwa z niej przeciwciała dla wszystkich frakcji proteidowych. Po absorpcji surowicy anty-*124* toksyną (toksoidem) usunięte zostają z niej przeciwciała dla wszystkich frakcji proteidowych. Surowica antytoksyczna wyabsorbowana szczepem PW_8 lub *124* przestaje reagować z frakcją N_3, z którą słabo oddziałuje surowica antytoksyczna nieabsorbowana.

Frakcje lipidowe reagują z surowicami: homologiczną, anty-PW_8 i antytoksyczną, przy czym najsłabiej reagują z surowicą antytoksyczną. Z surowic odpornościowych antymaczugowcowych dają się wyabsorbować krzyżowo przeciwciała przeciw lipidom maczugowców rzekomo błoniczych, których natomiast nie można wyabsorbować toksoidem (toksyną).

Toksyna błonicza i toksoid reagują jedynie z surowicą przeciw maczugowcom błonicy oraz z surowicą antytoksyczną, a nie oddziaływają z surowicą przeciw maczugowcom rzekomo błoniczym. Miano toksoidu i toksyny w surowicy homologicznej jest 4 - 5-krotnie wyższe, niż w surowicy przeciw szczepowi PW_8.

Z badań serologicznych wynika następujący wniosek:

1. Frakcjami antygenowymi swoistymi dla maczugowców błonicy szczep PW_8 (gatunkowo swoistymi) są: C_{1a} a także C_{1b}, C_{1c}, tj. frakcje cukrowe „kwaśne", oraz frakcja N_3.

2. Frakcje antygenowe serologicznie wspólne dla maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych (rodzajowo swoiste) są to: C_6, C_7, C_{8b}, C_{9b}, a znaczne pokrewieństwo serologiczne wykazują: C_2, C_3, C_{4a}, C_{4b}, C_5, C_{8a}, N_1 - N_{4b}, prawdopodobnie także N_5, N_7 i N_8, L_1, L_3 i L_5.

3. Frakcje antygenowe serologicznie wspólne dla maczugowców błonicy i dla toksyny: C_2, C_3, C_7, C_{11}, C_{12} i prawdopodobnie C_5, N_2 (wątpliwe), L_1, L_3, L_2.

4. Frakcjami antygenowymi swoistymi dla maczugowców rzekomo błoniczych (gatunkowo swoiste) są: C_1, C_2 (frakcje „kwaśne").

5. Frakcje maczugowców rzekomo błoniczych serologicznie wspólne dla maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych (rodzajowo swoiste): prawdopodobnie C_4 i częściowo C_3 i C_5, N_1 - N_3, L_1 i L_2.

6. Frakcją maczugowców rzekomo błoniczych serologicznie wspólną dla maczugowców rzekomo błoniczych i dla toksyny błoniczej jest N_3.

7. Frakcje maczugowców błoniczych serologicznie wspólne dla szczepu PW_8, szczepu *124* i dla toksyny (toksoidu): L_1, L_3, możliwe N_2.

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH MACZUGOWCÓW BŁONICY

1. WŁAŚCIWOŚCI TOKSYCZNE

W celu zbadania toksyczności otrzymanych frakcji maczugowców błonicy roztwory (zawiesiny) wodne poszczególnych frakcji wstrzykiwano pod otrzewną 2 - 3 myszkom białym o wadze około 20 g lub 1 - 2 świnkom morskim o wadze 400 - 500 g. Myszkom wstrzykiwano 0,1 - 3 mg frakcji, tj. 0,005 - 0,15 mg/g wagi, świnkom morskim 2 - 10 mg, tj. 0,005 - 0,25 mg/g wagi. Ponad to wstrzyknięto myszkom i świnkom zawiesinę szczepu PW_8 poddaną działaniu temperatury 121° przez 20 minut (w autoklawie); gęstość optyczna zawiesiny D = 40 - 90 (oznaczona w fotokolorymetrze Bonet-Maury).

Obserwacje zwierząt trwały 2 - 3 tygodni. W wypadku śmierci zwierząt wykonywano szczegółową sekcję. Toksyczne działanie frakcji maczugowców błonicy manifestowało się przekrwieniem i powiększeniem nadnerczy (wyraźnym u świnek morskich), wylewem krwawym do nadnerczy i przesiękiem w jamie opłucnej, rzadziej w jamie otrzewnej. Dość często obserwowano zrost worka osierdziowego z opłucną ścienną. Wszystkie te zmiany były podobne do obrazu powstającego pod wpływem toksyny błoniczej.

Wyniki badań można streścić następująco:

Wszystkie frakcje cukrowcowe i lipidowe maczugowców błonicy w stężeniu przeciętnie 0,05 - 0,15 mg/g wagi są toksyczne dla myszek białych, a nietoksyczne w dawce poniżej 0,05 mg/g wagi; dla świnek morskich toksyczne są w dawce 0,025 mg/g wagi; nietoksyczne w dawce 0,015 mg/g wagi. Autoklawowany szczep PW_8 był toksyczny w dawce 0,2 - 0,3 ml zawiesiny o gęstości optycznej D = 90.

Myszki białe padały po 2 - 5 dobach po wstrzyknięciu frakcji maczugowców w dawce toksycznej lub szczepu PW_8 autoklawowanego; świnki morskie padały przeciętnie po 10 dniach. Myszki białe i świnki morskie wykazywały podobną wrażliwość na frakcje maczugowców błonicy i na autoklawowany szczep PW_8. Zasługuje na uwagę fakt, że zawarty w substancjach komórki maczugowca błonicy czynnik toksyczny odznacza się znaczną ciepłoodpornością.

2. ODCZYNY SKÓRNE

Odczyny skórne wykonano u królików albinosów. Na jednym króliku dokonywano przeciętnie 10 wstrzyknięć śródskórnych. Do ogolonej skóry wprowadzano cienką igłą 0,1 - 0,2 ml roztworów (zawiesin) frakcji cukrowych, proteidowych i lipidowych w stężeniu 2 - 4 mg/ml.

Kontrola: roztwór fizjologiczny użyty do rozcieńczenia frakcji; kontrola dodatnia: anatoksyna oraz zawiesina szczepu PW_8 ogrzanego w temperaturze 100° przez 1 godzinę (gęstość optyczna D = 30). Frakcje lipidowe i cukrowe wyjałowiono przed użyciem ogrzewając je w 100°; do frakcji proteidowych dodano sulfatiazolu do stężenia końcowego 10 mg/ml.

Wyniki odczynów odnotowywano po 3, 6, 18, 48 i 72 godzinach. Odczyn dodatni, zaczerwienienie o średnicy 1 - 2 cm, rzadko z nieznacznym obrzękiem w miejscu wstrzyknięcia, występował przeciętnie po

18 - 24 godzinach od wstrzyknięcia poszczególnych typów frakcji. Martwicy po wstrzyknięciu frakcji maczugowców błonicy nie obserwowano.

Próba kontrolna z roztworem fizjologicznym była ujemna. Po wstrzyknięciu anatoksyny i szczepu PW_8 ogrzanego występował odczyn skórny o typie podobnym jak po wstrzyknięciu frakcji chemicznych szczepu PW_8.

3. WŁAŚCIWOŚCI UODPARNIAJĄCE FRAKCJI MACZUGOWCÓW BŁONICY

Do doświadczeń tych przygotowano roztwory (zawiesiny) poszczególnych frakcji szczepu PW_8 w roztworze fizjologicznym w stężeniu 4 mg/ml. Frakcje cukrowcowe i lipidowe wyjaławiano ogrzewając je w 100° przez 10 minut; frakcje proteidowe rozpuszczono najpierw w 1/10 N NaOH, zobojętniono 1/10 N HCl i dolewano jałowego roztworu fizjologicznego do końcowego stężenia 10 mg/ml.

Świnkom morskim wagi 300 - 400 g wstrzyknięto podskórnie w okolicę pachwinową po 1 mg poszczególnych frakcji. Ponad to wstrzyknięto kilku świnkom 0,5 ml zawiesiny szczepu PW_8 w soli fizjologicznej, ogrzanej w autoklawie w 121° przez 10 minut (gęstość optyczna D=30), lub 0,2 ml anatoksyny błoniczej.

W pierwszej serii doświadczeń wstrzykiwanie wykonywano jednokrotnie, w dalszej serii — dwukrotnie w tej samej dawce, w odstępach 10 - 14-dniowych. Po 14 - 20 dniach po ostatnim wstrzyknięciu wszystkie świnki oraz świnkę kontrolną (nie uodparnianą) zakażono podskórnie jednakową dawką 0,2 ml zawiesiny żywego szczepu PW_8 (48-godzinnej hodowli na podłożu Löfflera, gęstość optyczna zawiesiny D=30).

Po zakażeniu okres obserwacji świnek morskich wynosił 30 - 60 dni. W wypadku śmierci zwierząt wykonywano szczegółową sekcję.

Do III serii badań wybrano te frakcje maczugowców błonicy, przy użyciu których w poprzednich doświadczeniach stwierdzono największy odsetek przeżywających świnek morskich, tj. frakcje C_2, C_3, N_2, N_9, R.

Przygotowano następujące mieszaniny tych frakcji (po 1 mg poszczególnych frakcji): N_9R, N_9RC_3, $N_9N_2RC_3$, N_2R, N_2C_2R, N_9C_2, $N_9N_2C_3$, N_9C_3.

Mieszaniny N_9R, N_9C_2 i N_9RC_3 okazały się toksyczne (świnki morskie po ich wstrzyknięciu padały w ciągu 6 - 11 dni); z tego względu mieszaniny te wyłączono z dalszych doświadczeń. Częściowo toksyczne były również mieszaniny N_2C_2R (z grup 10 świnek padły po 2 świnki, którym wstrzyknięto te mieszaniny).

Pozostałe mieszaniny frakcji maczugowców błoniczych wstrzyknięto podskórnie dwukrotnie w odstępach 10-dniowych grupom złożonym z 10 świnek morskich. Dla porównania, mniejszym grupom świnek wstrzyknięto dwukrotnie anatoksynę błoniczą oraz autoklawowany szczep PW_8 w dawkach, jak w poprzednich doświadczeniach; poza tym szczep maczugowców rzekomo błoniczych Nr *124* (autoklawowaną zawiesinę 48-godzinnej hodowli o gęstości optycznej D=30, w objętości 0.2 - 0,3 ml). Wyniki wszystkich serii badań zestawiono w tabeli VI.

Spośród użytych w tych badaniach biologicznych frakcji maczugowców błonicy — szczep PW_8 tylko frakcje cukrowe C_2 i C_3, sympleks R oraz frakcje proteidowe N_2 i N_9 posiadają pewne właściwości wywoływania w ustroju świnek morskich odczynów ochronnych przeciw zakażeniu żywym szczepem maczugowców błonicy. Właściwości chroniące

TABELA VI

Zestawienie wyników badań właściwości uodparniających frakcji maczugowców błonicy PW_8 przeciw zakażeniu świnek morskich żywym szczepem maczugowca błonicy

The protective properties of various fractions obtained from *C. diphteriae* PW_8 in diphteria experimental infection in guinea pigs

Uodparniane frakcją Immunised with fraction	Przeżyły survived szczepiono infected	Padły w ..... dni po zakażeniu Death at ..... days after infection	Przeżyły survived szczepiono infected	Padły w ..... dni po zakażeniu Death at ..... days after infection
C_{1a}	0/2	2 - 5	0/3	2 - 7
1b	0/2	4	0/3	5
1c	0/2	4	0/2	5
2	0/2	10	4/5	15
3	0/2	5	4/5	6
4	0/2	11	0/3	9 - 16
5	0/2	4	0/3	5
7	0/2	3 - 10	0/3	2 - 15
8a	0/2	10	0/3	15
8b	1/2	3	0/3	3 - 4
9a	0/2	3	0/2	4 - 7
9b	0/2	5	0/2	4 - 6
10	0/2	3	0/2	3
R	0/2	12	3/5	12 - 17
N_1	0/2	3 - 7	0/3	11
2	0/2	6 - 10	4/5	15
3	0/2	4	0/2	5
4	0/2	2 - 8	0/3	5 - 11
5	0/2	4	0/2	5
6	0/2	1 - 4	0/2	5
7	0/2	2 - 4	0/2	5
8	0/2	4	0/2	5 - 12
8	2/2	—	4/5	17
L_1	—	—	0/2	6 - 15
2	—	—	0/2	2 - 5
3	—	—	0/2	2 - 5
4	—	—	0/2	7 - 11
5	—	—	0/2	7 - 11
całe komórki szczepu *124* — whone — whole cells of PW_8, autoclaved	1/2	5	4/5	30
całe komórki szczepu *124* — whole cells of strain *124*	—	—	4/5	11
anatoksyna	0/2	15	0/3	4
kontrola (nieuodp.)	—	—	0/3	1 - 2
N_9C_3	—	—	0/5	3
$N_9C_2C_2$	—	—	0/5	3 - 5
N_2R	—	—	8/10	12*
N_2C_2R	—	—	8/10	12*
$N_2C_3N_9R$	—	—	10/10	—
N_2C_2	—	—	10/10	—

* Świnki te padły przed zakażeniem ich szczepem maczugowców
These animals died before the infection with *C. diphteriae*

zwiększają się w wypadku dwukrotnego uodporniania świnek morskich zespołami tych frakcji (N_2 C_2, $N_2C_3N_9R$ oraz N_2R i N_2C_2R).

Sekcja 4 świnek morskich, które padły po wstrzyknięciu zespołów frakcji N_2C_2R i N_2R wykazała: płyn przesiękowy w opłucnej, zrost serca z opłucną ścienną, przekrwienie i powiększenie nadnerczy, wylewy krwawe do nadnerczy. Sekcje pozostałych świnek, które przeżyły po następującym zakażeniu żywym szczepem maczugowców błonicy, wykonane po 60-dniowej obserwacji nie wykazały jakichkolwiek zmian patologicznych w narządach.

Z doświadczeń tych wynika, że zespół frakcji maczugowców błonicy: N_2C_2 oraz $N_2C_3N_9R$, jak również zespoły N_2R i N_2C_2R uodparniają świnki morskie i chronią je przed zakażeniem żywym, toksycznym szczepem maczugowców błonicy PW_8 w stopniu co najmniej równym jak uodpornienie antytoksyną i autoklawowanym szczepem PW_8.

Komórka maczugowca błonicy

Woda 84,5% (83%)	Substancje organiczne 10,9% (12,5%) C - 48,9% N - 9,75 - 12,8%. H - 8,6%. O ok. 30%			Popiół 4,6% (4,5%)
Białko 63,4 - 86,25% (84%)	Kwasy nukleinowe H_3PO_4	Cukry 5 - 11% (7%)		Lipidy 4,9 - 7,9% (9%)
Aminokwasy:	(0,38 - 1,55% P)	d-arabinoza		
leucyna 4,8%		d-mannoza		Tłuszcze wolne:
arginina 4,25%	ryboza	glikoza		Rozp. w acet. 3,91%
lizyna 3,34%	dezoksyryboza	galaktoza		trudno rozp. w acetonie 0,25%
walina 3,20%		glikozamina		N 0,24%
tyrozyna 2,40%	adenina	chondrozamina		P 0 - 1,45%
histydyna 0,48%	gwanina	kwas uronowy		Subst. red. 2,2%
cysteina 1,9%				kwas palmitynowy 30%
izoleucyna	tymina	N og. 0,23 - 3,1%		(30% kwasów tłuszcz.)
1-prolina	cytozyna	(0,4 - 4,44%)		kw. palmito-oleinowy
tryptofan	uracyl			kw. heksadecenowy
kw. diaminopimelinowy		P 0,12 - 0,25%		kw. dyfterynowy
N 12,8%		(0 - 0,22%)		kw. korynomykolinowy
(1,53 - 13,56%)		Pentozy 4,2 - 5,0%		kw. korynomykoleinowy
P 0,6 - 2,14%				kw. α-oksykorynowy
(0,22 - 1,93%)		Cukry red.		kw. α-korynowy
		24 - 98%		kw. β-oksykorynowy
		we frakcjach		kw. β-korynowy
		0 - 100%		kw. nienasycony $C_{14}H_{26}O_2$
				ślad kw. masłowego, stearynowego i ceretynowego
Tłuszcze związane — 0,87%		Mikrozydy (etery pentoz lub heksoz i pentoz z kwasami tłuszczowymi C_{19}—C_{38})		Fosfatydy (monoaminomonofosfatydy) 0,41%
66,6% wolnych kwasów tłuszczowych		P 0,58%		(N - 0.35 — 0.45%)
				(P 0,54—0.62%)
				Woski 0,25 - 1,83%

Zestawiono na podstawie prac: Biełozierski, Korczagin i Smirnow 1950, Chargaff i Moore 1931, Chargaff 1931, 1933, 1939, Gubariew i współpr. 1941, 1942, 1945, 1948, 1951, 1952, 1953, Holdsworth 1951, 1952, Orłowa 1950, 1953, Pudles i Lederer 1951, 1953, Tamura 1914, Wong i T'Ung 1939, 1940.

DYSKUSJA I WNIOSKI

1. Przegląd badań nad właściwościami chemicznymi maczugowców podany będzie w oddzielnej pracy, która ukaże się w „Acta Microbiologica Polonica". Schematycznie budowę chemiczną komórki maczugowca błonicy przedstawia przytoczone zestawienie oparte na wynikach ogłoszonych w piśmiennictwie i na własnych badaniach (liczbowe dane z własnych badań podane są w nawiasach). Stwierdzono dużą zgodność wyników obcych i własnych badań chemicznych.

2. Właściwości antygenowe. Struktura antygenowa drobnoustrojów należących do rodzaju *Corynebacterium* jest złożona. Charakteryzują ją: różnice immunologiczne między szczepami jednego gatunku, wspólność antygenów między szczepami należącymi do różnych gatunków *Corynebacterium*, a nawet innych rodzajów bakterii.

W obrębie gatunku *C. diphteriae* metodą aglutynacji prostej lub aglutynacji krzyżowej, po absorpcji surowic odpornościowych, odróżniono około 57 typów serologicznych (Orr-Ewing, Hewitt i inni). Reakcje krzyżowe występowały między niezjadliwymi lub zjadliwymi maczugowcami błonicy a *C. hofmannii* i *C. xerose* (Bailey). Antygenowe pokrewieństwo stwierdzono również w obrębie dyfteroidów roślinnych i glebowych zaliczanych do rodzaju *Corynebacterium*.

Metodą aglutynacji z surowicami absorbowanymi odróżniono w komórkach *C. diphteriae* 2 antygeny: antygen powierzchniowo-somatyczny *K*, ciepłochwiejny, typowo swoisty i antygen somatyczny *O*, ciepłooporny, gatunkowo swoisty.

W komórkach *C. hofmannii* i *C. ovis* odróżnia się trzy typy antygenu *O: A, B, C*.

Antygen *K* maczugowców błonicy, według przypuszczeń Wonga i T'Unga, wiąże się z białkową frakcją, antygen *O* — z frakcją cukrową maczugowca błonicy. Takie zróżnicowanie wydaje się jednak zbyt uproszczone. Antygeny białkowe mogą bowiem mieć swoistość typową lub gatunkową w zależności od sposobu przygotowania frakcji; np. frakcja proteidowa spreparowana przez Wonga i T'Unga przy użyciu 1-procentowego KOH we wrzącej łaźni wodnej miała swoistość gatunkową i dość niską aktywność serologiczną. Inne frakcje posiadały natomiast swoistość typową. Część tych frakcji traciła jednak swoistość typową po ogrzaniu w 122° przez 20 minut lub w 56° przez 30 minut, zmieniając się w białko gatunkowo swoiste.

Spośród naszych frakcji proteidowych prawie wszystkie wykazywały powinowactwo nie tylko do homologicznej surowicy, lecz także do przeciwciał wytworzonych w ustroju królików po uodpornieniu komórkami maczugowców rzekomo błoniczych. Tylko ostatnia frakcja proteidowa N_9, przygotowana po hydrolizie z ługiem na gorąco, wykazała swoistość wyłącznie gatunkową. Frakcja N_0, stosunkowo silnie aktywna serologicznie, zawierająca zaledwie 3.5% białka wykrywalnego metodą Folina-Ciocalteau oraz 0,88% rybozy, ciepłooporna, jest, być może, tym somatycznym antygenem, który odróżniono metodą aglutynacji.

Aktywność innych frakcji proteidowych maczugowców błonicy wahała się w szerokich granicach miana, od 4000 do 250 000 (frakcja N_6 była serologicznie w ogóle nieczynna). Frakcje maczugowców rzekomo błoniczych były serologicznie nieco mniej aktywne (miano 16 000 - 64 000). Antygeny

cukrowe maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych odznaczają się stosunkowo większą aktywnością serologiczną niż frakcje proteidowe. Reagowały one z homologiczną surowicą w mianie przeważnie 125 000 - 1 000 000, tj. były serologicznie kilkakrotnie aktywniejsze niż cukrowe frakcje Wonga i T'Unga i znacznie aktywniejsze od wielocukrów Riachiny.

Antygeny cukrowe maczugowców przeważnie nie wykazują serologicznej swoistości dla typu ani dla gatunku. Według doświadczeń Wonga i T'Unga wielocukry komórek *C. diphteriae* wszystkich grup, *C. xerose* i dyfteroidów są serologicznie pokrewne, natomiast cukry maczugowców Hofmanna oddziałują z homologiczną surowicą w mianie 1 : 100 000, a z surowicą dla innych gatunków maczugowców tylko w rozcieńczeniu antygenów 1 : 100. Nasze doświadczenia wykazują, że „zasadowe" frakcje cukrowe *C. diphteriae* i *C. pseudodiphteriae* reagują z surowicą homologiczną i heterologiczną, nie są więc gatunkowo swoiste, natomiast frakcje cukrowe „kwaśne" tych szczepów są serologicznie swoiste dla gatunku.

Frakcje lipidowe maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo błoniczych (według własnych badań) oraz *C. diphteriae, C. hofmannii, C. xerose* i dyfteroidów (według doświadczeń Wonga i T'Unga) mają swoistość ponadgatunkową.

Teoretycznie i praktycznie ważne znaczenie ma stwierdzenie antygenowego pokrewieństwa substancji zawartych w toksynie (toksoidzie) błoniczej i w maczugowcach błonicy, wytwarzających tę toksynę. Spanedda (1937) pierwszy wykazał, że surowica przeciwmaczugowcowa reaguje z przesączem hodowli homologicznego szczepu *C. diphteriae*. Pillemer i współpr. (1947) stwierdzili, że frakcja *PV* oczyszczonej toksyny błoniczej reaguje z surowicą przeciwmaczugowcową. Fuks (1954) wykrył obecność białka maczugowców w kilku badanych seriach toksyny i toksoidu błoniczego. We własnych doświadczeniach stwierdzono, że frakcja cukrowa „zasadowa" C_2, C_3, C_7 i prawdopodobnie C_5 oraz frakcje cukrowe wyizolowane z fosfatydów maczugowców błonicy są serologicznie pokrewne substancjom zawartym w toksynie błoniczej. Poza tym pewne pokrewieństwo wykazuje frakcja proteidowa N_2. (Oddziaływanie frakcji lipidowych L_1, L_3 i F_{2a-b} z surowicą antytoksyczną trzeba prawdopodobnie przypisać właściwościom nieswoistych frakcji lipidowych reagujących z wszystkimi używanymi w doświadczeniach surowicami odpornościowymi).

Fakt ten wydaje się nam szczególnie ważny i znamienny w związku z tym, że właśnie te frakcje oraz frakcja N_0 (swoiste dla maczugowców błonicy) i sympleks *R* (serologicznie nieczynny) okazały się immunologicznie najczynniejsze w próbach uodporniania świnek morskich przeciw zakażeniu żywym maczugowcem błonicy.

Stwierdzenie uodporniających właściwości zespołów wymienionych frakcji maczugowców błonicy pozwala na podstawie przedstawionych badań wysnuć wniosek, że możliwe jest uodpornianie zwierząt przeciw błonicy odpowiednimi frakcjami chemicznymi maczugowców błonicy oraz, że uodporniające działanie stosowanej u ludzi anatoksyny błoniczej uwarunkowane jest w części obecnością w niej substancji pochodzących z ciała maczugowców błonicy.

LITERATURA

1. Bailey G., 1925: *J. Immunol.*, **10** : 791.
2. Bell A., 1922: *J. Roy. Army Med. Corps*, **36** : 48.
3. Biełozierski A., Korczagin W., Smirnow T., 1950: *D.A.N. SSSR*, **71** : 89.
4. Chargaff E., Moore D., 1931: *Zeitschr. physiol. Chemie*, **200** : 191.
5. Chargaff E., 1931: *Zeitschr. physiol. Chem.*, **200** : 196.
6. Chargaff E., 1933: *Zeitschr. physiol. Chem.*, **218** : 223.
7. Chargaff E., 1940: *Rept. Proc. III Int. Congr. Micr.*, 1939 : 223.
8. Durand P., 1918, 1920: *C. r. Soc. Biol.*, **81** : 1011 i **81** : 611.
9. Durand P., Guerin J., 1921: *C. r. Soc. Biol.*, **84** : 980.
10. Eagleton A., Baxter E., 1923: *J. Hyg.*, **22** : 107.
11. Fuks J., 1954: *Żurnał Mikr. Epid. Imm.*, **8** : 72.
12. Gubariew E., 1941, 1942: *Sbornik Trud. WIEM*, : 77.
13. Gubariew E., 1942: *Biochimija*, **7** : 180.
14. Gubariew E., Lubienec E., 1948: *DAN SSSR*, **10** : 413.
15. Gubariew E., Gałajew J., 1953: *Biochimija*, **18** : 37.
16. Gubariew E., Gawriłowicz A., Sztulbaum F., 1952: *Biochimija*, **17** : 303.
17. Gubariew E., Lubieniec E., Kauczuk A., 1951: *Biochimija*, **16** : 139.
18. Gubariew E., Wakulenko J., 1945: *Biochimija*, **10** : 285.
19. Havens L., 1920: *J. Inf. Dis.*, **26** : 388.
20. Hewitt L., 1947: *Brit. J. Exp. Path.*, **28** : 338.
21. Hirsch J., 1932: *Z. Hyg.*, **114** : 195.
22. Holdsworth E., 1952: *Biochim. Biophys. Acta*, **8** : 110.
23. Holdsworth E., 1951: *Biochim. J.*, **49** : XIV.
24. Kolmer J., 1912: *J. med. Res.*, **26** : 372.
25. Langer H., 1916: *Zentr. Bakter. I*, **78** : 117.
26. Lahiri D., 1952: *Indian J. med. Res.*, **2** : 265.
27. Lautrop H., 1950: *Acta Path. Micr. Scand.*, **26** : 443.
28. Mann S., 1922: *J. Immunol.*, **13** : 7.
29. Manshejm E., 1930: *Zentr. Bakter., I*, **115** : 113.
30. Murata R., Kurakawa M., 1952: *Jap. Med. Biol.*, **5** : 239.
31. Nishimoto G., 1936: *Z. Immunitaetsfg.*, **89** : 18.
32. Oeding P., 1949: *Acta Path. Micr. Scand.*, **26** : 862.
33. O'Meara R., 1950: *Wochschr. Kinderheilk.*, **37** : 345.
34. Orłowa O., 1950: *Biochimija*, **15** : 362.
35. Orłowa O., 1953: *Biochimija*, **18** : 683.
36. Orr-Ewing J., 1933: *J. Path. Bacter.*, **37** : 345.
37. Pappenheimer A., Lawrence H., 1948: *Amer. J. Hyg.*, **47** : 226, 233.
38. Pillemer A., Toll D., Badger S., 1947: *J. Biol. Chem.*, **170** : 21.
39. Przesmycki F., Goliborska T., Lachowicz K., Seydel J., 1936, 1938: *Med. Dośw. i Społ.*, **22** : 25 i **23** : 1.
40. Pudles J., Lederer E., 1953: *Biochim. Biophys. Acta*, **11** : 163.
41. Pudles J., Lederer E., 1951: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33** : 1003.
42. Pope C., Stevens M., 1951: *Brit. J. Exp. Path.*, **22** : 246.
43. Przewoski W., 1912: *Zentr. Bakter., I*, **65** : 5.
44. Poxson W., Redowitz E., 1922: *J. Immunol.*, **7** : 69.
45. Robinson D., Peeney A., 1936: *J. Path. Bacter.*, **33** : 403.
46. Simic, Ivanic, 1931: *Zentr. Bakter. I*, **120** : 432.

47. Stone R., 1924: *J. Inf. Dis.*, **34** : 312.
48. Stuber, 1915: *Münch. med. Wochschr.*, : 1173.
49. Stroeder J., Schneider D., 1954: *Zeitschr. Hyg. Infkr.*, **139** : 9.
50. Stroeder J., *Ergebn. inn. Med.*, : 62.
51. Spanedda A., 1937: *Boll. Soc. Micr. Ital.*, **9** : 32.
52. Tamura S., 1914: *Hoppe-Seyl. Ztschr. phys. Chem.*, **89** : 289.
53. Wildführ G., 1949: *Zentr. Bakter. I*, **154** : 14.
54. Wildführ G., 1950: *Z. ges. inn. Med.*, **5** : 765.
55. Wong S., T'Ung T., 1938: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38** : 107.
56. Wong S., T'Ung T., 1938: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **39** : 422.
57. Wong S., T'Ung T., 1939: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **40** : 824.
58. Wong S., T'Ung T., 1939: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **40** : 356.
59. Wong S., T'Ung T., 1939: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **41** : 160.
60. Wong S., T'Ung T., 1940: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **43** : 749.

J. Kwapiński

INVESTIGATIONS ON THE ANTIGENIC CONSTITUENTS OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE*

Summary

The bacterial cells (470 g of dry weight) of *Corynebacterium diphteriae* (*Park-Williams strain N° 8*) and (19,5 g) of *Corynebacterium hofmannii* were stepwise fractionated by the author's method (schema 1 - 2) yielding 29 and 11 chemical fractions respectively. The physical and chemical properties of isolated fractions were investigated; the data are given in tables I and II. The table on page 346 shows the chemical composition of *C. diphteriae*.

The antigenic properties of various fractions of *C. diphteriae* and *C. hofmannii* were investigated by the complement fixation test. 18 antisera, produced by immunizing the rabbits with *C. diphteriae* and *C. hofmannii* cells and with diphterial toxoid-toxin were used. The fractions were diluted (from 1 : 1000 to 1 : 1 000 000) and their antigenic capacity was examined in homologous and heterologous unadsorbed and adsorbed sera. The results of these investigations are presented in tables III - V, and figures 5 - 14.

The tested antisera reacted less effectively with the proteide fractions (the titre 1 : 4000 - 1 : 250 000) much better with polysaccharide and lipide fractions (the titre 1 : 125 000 - 1 : 1000 000).

All proteide fractions of *C. diphteriae* and *C. hofmannii* reacted with homologous and heterologous immune sera, except the termostabile fraction N_9 which probably is identical with the species-specific somatic antigen. The polysaccharide fractions of *C. diphteriae* and *C. hofmannii* extracted with 0,5 - 5,0% acetic acid were species-specific. On the contrary, the „alcalinic" polysaccharide fractions reacted as well with homologous as with heterologous sera.

The lipide fractions of both species showed group-specificity.

The immunological cross-reactions between some „alcalinic" polysaccharide fractions (C_2, C_3, C_7, possibly C_5), polysaccharide fractions isolated from the phosphatides, proteide N_2 and some constituents of unpurified diphteria toxin were shown to occur.

These fractions serologically related to the toxin, the species-specific proteide fraction N_9 and the serologically inactive symplex R showed the highest protective power in experimental diphteria infection in guinea pigs (table VI).

The protective value of various constituents isolated from *C. diphteriae* and of their mixtures were examined on guinea pigs subsequently infected with lethal dosis of *C. diphteriae*, strain PW_8. It was observed that the mixtures of fractions N_2C_2 and $N_9C_2N_9R$ protected all animals against the lethal dosis of living bacteria

injected 14 - 20 days after the immunisation. On the ground of these experiments it is supposed that:

1. it is possible to immunise the animals against diphterial infection with suitable chemical fractions of *C. diphteriae* cells,

2. the immunising properties of the toxoid may be partially conditioned by the presence in the toxoid of some constituents of bacterial cells.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 353 - 370

J. Parnas i *T. Mierzejewski*

BADANIA BIOCHEMICZNE I IMMUNOCHEMICZNE NAD PAŁECZKAMI *BRUCELLA*

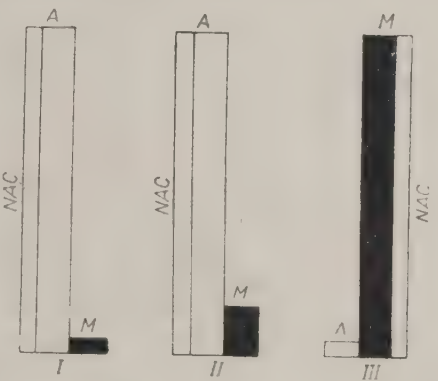
Z Zakładu Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie

Wpłynęło 5 maja 1956 r.

Duże znaczenie w swoistości cech immunologicznych komórki bakteryjnej przypisuje się antygenom somatycznym. Strukturę ich poznano dotychczas u niewielu bakterii.

Własności pełnych antygenów otrzymywanych przy pomocy różnych metod z komórek *Brucella* opisywało wielu autorów: Słabospicki (1941), Wiersziłowa (1941, cytat Dubrowskiej 1950), Huston, Huddleson, Hershey (1943), Miles, Pirie (1939), Lisbonne, Monniér (1936), Dambovicenu, Barber, Pop, Marinov (1938), Paterson, Pirie, Stableforth (1947), Dubrowska (1950, 1951, 1954), Parnas, Mierzejewski, Feltynowski, Łazuga (1955), Pannell (1950).

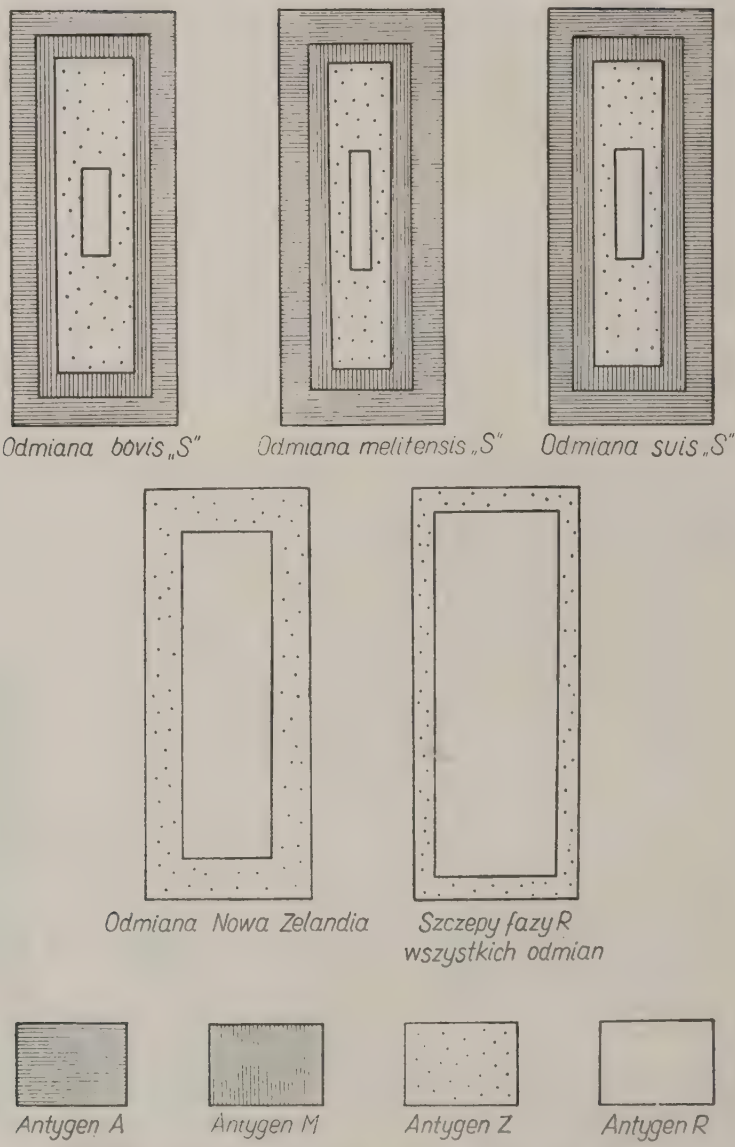
W badaniach serologicznych stwierdzono, że *Brucella* zawiera dwa podstawowe antygeny: *A* i *M* (Wilson i Miles, 1932, według Dubrowskiej 1950).



Rys. 1. Schemat budowy antygenowej pałeczek *Brucella* (według Wilsona i Milesa). *I* — odmiana *bovis*, *II* — odmiana *suis*, *III* — odmiana *melitensis*, *NAC* = nieswoisty antygen cząstkowy (współaglutynacja z pałeczki tularemii, duru brzusznego), *A* = antygen *bovis*, *M* = antygen *melitensis*

Fig 1. Antigenic structure of *Brucella* — schematically (according to Wilson and Miles)

Przy pomocy metody wysycania aglutynin udało się wykazać, że poszczególne odmiany *Brucella* różnią się zawartościami antygenów *A* i *M*. Przedstawiony na rysunku 1 schemat Wilsona i Milesa nie znajduje dziś w dociekaniach serologicznych pełnego poparcia faktycznego (Chodkowski i Parnas, 1956). Ostatnio Renoux i Machaffey (1955)



Rys. 2. Schemat budowy antygenowej *Brucella* (według Renoux-Machaffey)
Fig. 2. Antigenic structure of *Brucella* — schematically (according to Renoux — Machaffey)

zaproponowali inny schemat struktury antygenowej odmian *Brucella*. Według tych autorów komórki fazy *R* wszystkich odmian zawierają prawie wyłącznie antygen *R*, wspólny dla wszystkich szczepów. Komórki fazy *S* odmiany *melitensis* zawierają antygen *R* i antygen *Z* (właściwy dla nowoopisanej odmiany nowozelandzkiej), antygen *M* i *A*. Komórki fazy *S* odmian *bovis* i *suis* zawierają te same substancje antygenowe, lecz w innych proporcjach (rysunek 2).

Damboviceanu, Barber, Pop i Marinov (1939, według Mikulaszka 1951) otrzymali z wszystkich odmian *Brucella* przy pomocy metody Boivina substancje antygenowe złożone z wielocukrów, kwasów tłuszczowych oraz substancji nierozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych i zasadach, a odczepiających po hydrolizie kwaśnej aminokwasy.

Dubrowska (1950, 1951, 1954), stosując metodę Boivina, ekstrahowała z *Brucella* złożony kompleks, w skład którego wchodzą dwa antygeny różniące się składem chemicznym: antygen lipo-wielocukrowo-białkowy oraz antygen zawierający obok swoistego wielocukrowca i białka kwas dezoksyrybonukleinowy. Swoiste wielocukrowce tych antygenów różnią się składem chemicznym; jeden z nich zbudowany jest z glikozy, kwasów heksuronowych i glikozaminy, drugi zaś zawiera ponadto galaktozę. Antygenowe kompleksy różnych odmian *Brucella* odznaczają się różnym stosunkiem poszczególnych substancji. W antygenowych kompleksach *B. suis* i *melitensis* przeważa antygen zawierający kwas dezoksyrybonukleinowy, u *B. bovis* antygen ten stanowi niewielką tylko część kompleksu. Silverman i Elberg (1950, cytowane według Dubrowskiej 1954) przy badaniu w ultrafiolecie substancji antygenowych otrzymanych drogą utrafiltracji i ultrawirowania ekstraktów fenolowych *Brucella* stwierdzili występowanie w nich pirydynowych i purynowych związków. Badania te zgodne są więc w zasadzie z badaniami Dubrowskiej.

BADANIA WŁASNE

CEL, METODYKA I MATERIAŁ UŻYTY DO BADAŃ WŁASNYCH

Celem niniejszej pracy było:

1. Poznanie składu chemicznego kompleksów białkowo-cukrowych, wydzielonych z *Brucella*.
2. Wykrycie ewentualnych różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami i odmianami *Brucella* w zdolności do tworzenia katalazy i ureazy.
3. Wyodrębnienie z *Brucella* sympleksów czynnych pod względem antygenowym oraz ich analiza.

Do oznaczania cukrów i aminokwasów w hydrolizatach sympleksów użyto metody chromatografii bibułowej. Katalazę oznaczano zmodyfikowaną metodą Huddlesona.

Materiał badawczy stanowiły krajowe szczepy *Brucella* kolekcji własnej (w tym 136 szczepów *B. bovis*, 14 *B. suis* i 5 *B. melitensis*) oraz wzorcowe szczepy odmiany *bovis*, *suis* i *melitensis*, otrzymane od prof. Stablefortha z Weybridge. Dla porównania zbadano również szczepy *Pasteurella multocida*, *P. tularense* i *P. rodentium*, zbliżone pod niektórymi względami do *Brucella*.

Chromatografię bibułową wykonano z antygenami otrzymanymi z wzorcowych szczepów odmian *bovis*, *suis* i *melitensis*, ze szczepu niezjadliwego *S. 19*, ze szczepu własnej kolekcji *PD* oraz z *P. multocida*, *P. rodentium* i *P. tularense*.

Próby na katalazę i ureazę wykonano ze szczepami *Brucella* kolekcji własnej. U wszystkich szczepów sprawdzono czystość fazy *S* metodą Henryego w modyfikacji własnej i metodą Brauna. Ilość pałeczek w 1 ml oznaczano według skali Brauna.

1. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

Hodowle agarowe *Brucella* przemyte płynem fizjologicznym zadawano dwukrotnie 5-procentowym roztworem kwasu trójchlorooctowego; otrzymane wyciągi sączono przez sączek 388 oraz wirowano, a następnie dializowano i zagęszczano pod próżnią do objętości 10 ml (ze 150 ml płynu wyjściowego). Zagęszczony dializat zadawano 8-krotną objętością bezwodnego acetonu. Osad wytrącany po 24 godzinach oddzielano od płynu przez wirowanie, przemywano acetonem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano proszek koloru kremowego, trudno rozpuszczalny w zimnej wodzie.

W próbach orientacyjnych roztwór osadu reagował ujemnie w odczynie Fehlinga, bardzo słabo dodatnio lub wątpliwie w ninhydrynowym i biuretowym, pozytywnie zaś w reakcji Molischa i Hellera. Przypuszczamy, że otrzymany osad jest sympleksem, w skład którego wchodzą węglowodany i białka. Rozbicia otrzymanego sympleksu dokonano na drodze łagodnej hydrolizy kwaśnej. W tym celu osad zadano 0,1 N kwasem octowym w stosunku 1 : 100, hydrolizując go na wrzącej łaźni wodnej przez 4 godziny. Otrzymano osad białka (dodatnie reakcje: biuretowa, ninhydrynowa), cieniutką warstewkę tłuszczową na powierzchni i płyn, w którym rozpuszczone były węglowodany (pozytywna reakcja Molischa). Osad usunięto przez wirowanie, przemyto 0,1 N kwasem octowym, acetonem i wysuszono w próżni. Suchy osad białka hydrolizowano w 20-procentowym HCl przez 21 godzin pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia. Hydrolizat, po usunięciu kwasu solnego, użyto do analizy chromatograficznej na aminokwasy.

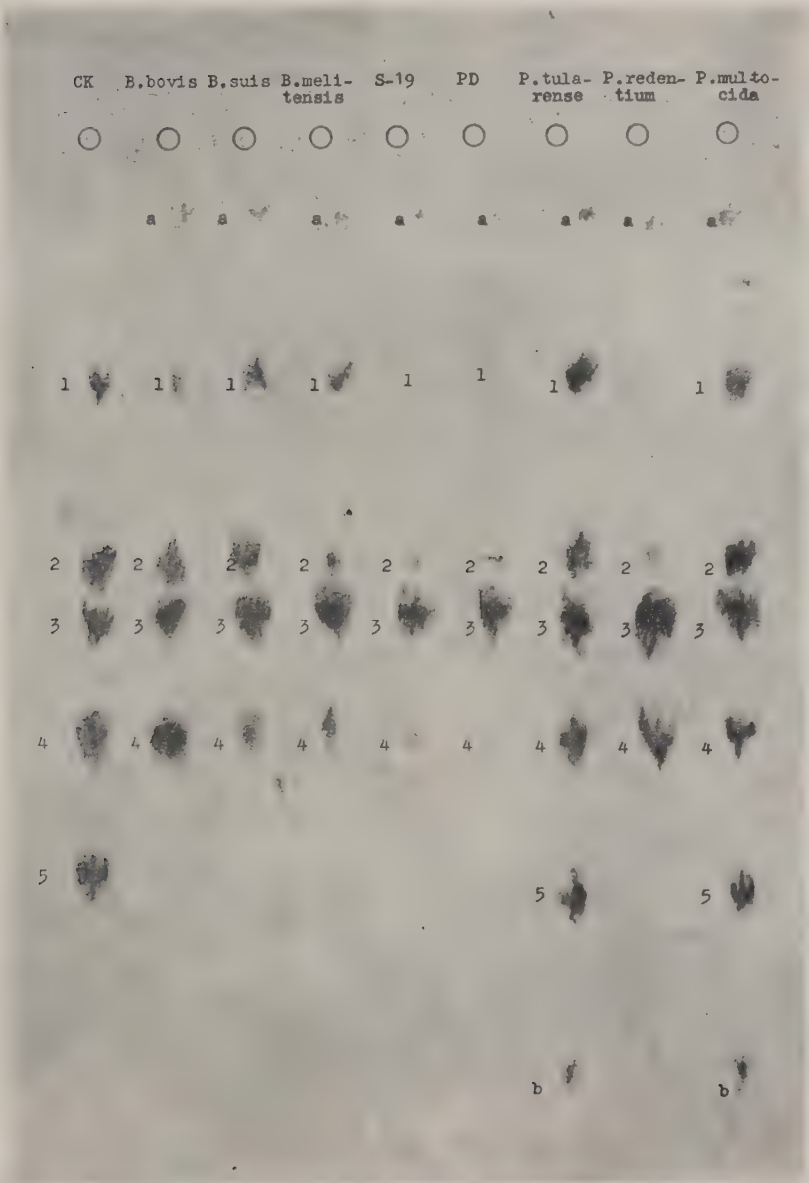
Węglowodany wytrącano 10-krotną objętością bezwodnego acetonu, przemywano acetonem i eterem, i po wysuszeniu hydrolizowano 6-procentowym kwasem solnym przez 6 godzin w 98 - 100° pod chłodnicą zwrotną. Hydrolizaty zobojętniano wodorotlenkiem sodu, odparowywano do sucha w próżni i odsalano na drodze ekstrakcji pirydynowej. Ekstrakt pirydynowy służył jako materiał wyjściowy do analizy chromatograficznej cukrów redukujących we frakcji węglowodanowej sympleksu.

Analizę chromatograficzną przeprowadzano według ogólnie stosowanej metody. Aminokwasy rozdzielano na bibule Whatman Nr 1 i 3 w układzie fenol — woda w stosunku objętościowym 7 : 3, propanol — woda (7 : 3), butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 5), butanol — metanol — woda (4 : 5 : 1) w chromatografii dwukierunkowej i jednokierunkowej oraz krążkowej. Jako wywoływaczy użyto 0,1-procentowego roztworu acetonowego ninhydryny i 0,2-procentowego roztworu izatyny.

Cukry rozdzielano na jednokierunkowym chromatogramie w układzie pirydyna—butanol—woda w stosunku objętościowym 25 : 45 : 40, który to układ umożliwia rozdzielenie cukrów prostych o zbliżonych współczynnikach rozdziału na bibule Whatman Nr 1 (Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska, 1950).

Chromatogramy cukrowe hydrolizatów sympleksów *Brucella* i *Pasteurella* przedstawiono w tabeli I. W tabeli II podano skład aminokwasowy hydrolizatów przy różnych stężeniach substratu na chromatogramie.

Chromatogramy hydrolizatu frakcji białkowej odmian *bovis, suis, melitensis, S-19* i *PD* nie wykazują różnic w składzie jakościowym (rysunek 4 i 5). Stale otrzymywano 15 - 17 plam, które umiejscowieniem i zabarwieniem w reakcji z ninhydryną i izatyną odpowiadają aminokwasom kontrolnym; 1. leucyna lub izoleucyna, fenyloalanina; 2. walina lub metionina; 3. prolina; 4. tryptofan; 5. tyrozyna; 6. alanina; 7. treonina; 8. lizyna; 9. glikokol; 10. seryna; 11. ?; 12. kwas glutaminowy; 13. kwas asparaginowy: 14. ?; 15. ? (cystyna?); 16. arginina; 17. histydyna. Niektóre z tych plam występują dopiero po naniesieniu na chromatogram większych ilości hydrolizatu; dotyczy to szczególnie aminokwasów ulegających zmianom podczas hydrolizy kwaśnej, a mianowicie; histydyny, argininy, tryptofanu i cystyny.



Rys. 3. Chromatogramy frakcji wielocukrowej *Brucella* i *Pasteurella*
CK — cukry kontrolne, 1 — glikozamina, 2 — galaktoza, 3 — glikoza, 4 — mannoza, arabinoza, fruktoza, 5 — ksyloza, a— ?, b — prawdopodobnie ryboza

Fig. 3. Chromatograms of hydrolysates of polysaccharide fraction of *Brucella* and *Pasteurella*

TABELA I

Hydrolizat frakcji wielocukrowej sympleksów białkowo-cukrowych
Analyses of the hydrolysate of polysaccharide fraction of glicoproteide-symplexes

Węglowodany Carbohydrates	*Brucella brucei*					*Pasteurella*		
	bovis	*suis*	*melitensis*	*S-19*	*PD*	*tularense*	*rodentium*	*multocida*
Kwasy heksurowe Uronic acids	+	+	+	±	±	+	+	+
Glikoza Glucose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Galaktoza Galactose	+++	+++	+	+	+	+++	±	+++
Glikozamina Glucosamine	+	+++	++	±	±	+++	−	+++
Mannoza Mannose	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++
Ksyloza Xylose	−	−	−	−	−	++	−	+
Ryboza Ribose	−	−	−	−	−	+	−	+

+++ iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy — 1,5 - 2,5 cm² — azotan srebra, anilina } silny odczyn

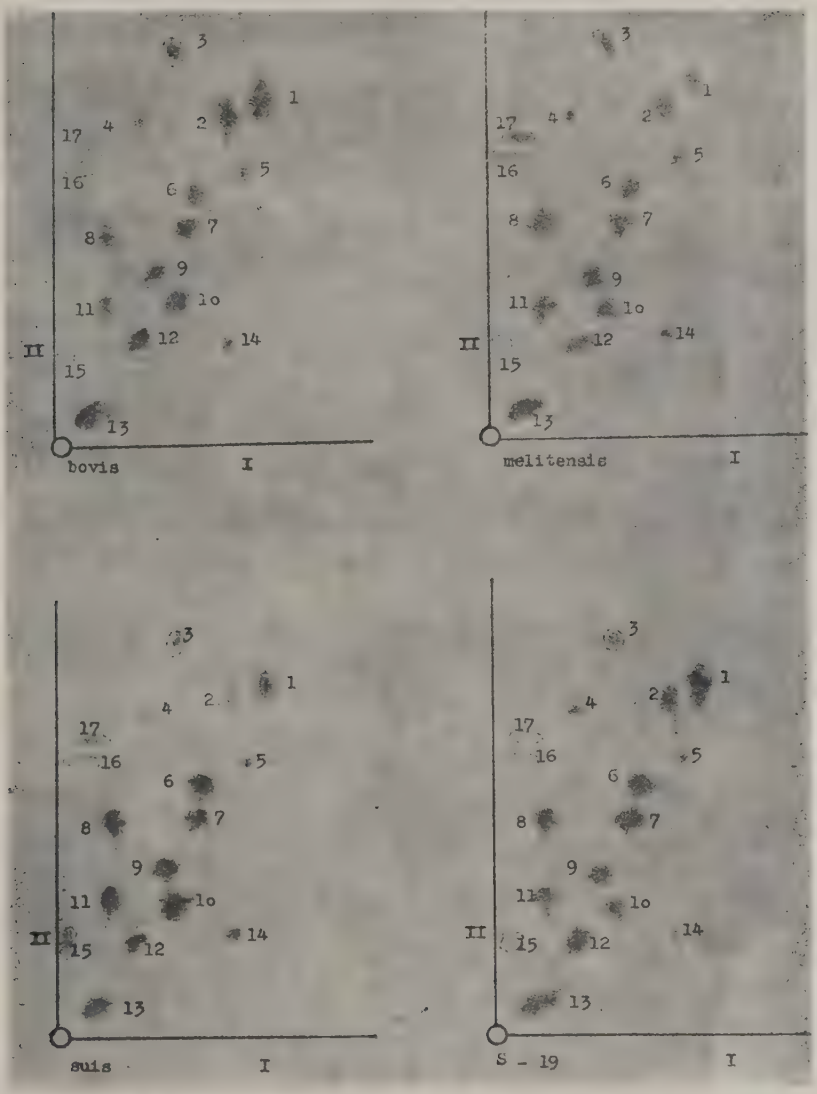
++ iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy — 1,0 - 1,5 cm² — azotan srebra, anilina } średni odczyn

+ iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy do 1,0 cm²; z azotanem srebra — odczyn dodatni, z aniliną — słaby

± iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy — 1,0 cm²; azotan srebra — odczyn dodatni, anilina — wątpliwy

Skład aminokwasowy hydrolizatów frakcji białkowej *P. multocida*, *P. rodentium* i *P. tularense* jest podobny do składu hydrolizatów *Brucella*. Jedynie tylko wielkość plam poszczególnych aminokwasów jest różna, zwłaszcza argininy, histydyny, tryptofanu, cystyny i tyrozyny, które pojawiają się wyraźnie dopiero po naniesieniu na chromatogram trzykrotnie większych ilości substratu niż u *Brucella*. Widzimy zatem, że skład jakościowy aminokwasów *Brucella* i *Pasteurella* jest podobny; na podstawie wielkości plam można jedynie przypuszczać, że różnice (jeśli występują), dotyczą raczej składu ilościowego. Należy więc przyjąć, że frakcje białkowe badanych drobnoustrojów są podobne; o zasadniczych różnicach bez przeprowadzenia oznaczeń ilościowych badanych frakcji mówić nie można.

Jak widać z tabeli I i z rysunku 3 — hydrolizaty frakcji wielocukrowej sympleksów białkowo-cukrowych *Brucella* oraz *P. tularense*, *P. rodentium* i *P. multocida* — wykazują szereg plam redukujących acetonowy roztwór azotanu srebra i barwiących się na brunatno i różowo po zastosowa-



Rys. 4. Chromatogramy hydrolizatów frakcji białkowej *Brucella*

Fig. 4. Chromatograms of hydrolysate of proteide fraction of *Brucella*

1 — izoleucyna, leucyna, fenyloalanina, 2 — metionina, walina, 3 — prolina, 4 — tryptofan, 5 — tyrozyna, 6 — alanina, 7 — treonina, 8 — lizyna, 9 — glikokol, 10 — seryna, 11 — ?, 12 — kwas glutaminowy, 13 — kwas asparaginowy, 14 — ?, 15 — cystyna, 16 — arginina, 17 — histydyna.

niu butanolowego roztworu aniliny. Plamy na chromatogramie odpowiadają umiejscowieniem i zabarwieniem cukrom kontrolnym: glikozie, galaktozie, glikozaminie, mannozie (lub fruktozie i arabinozie), ksylozie i 2 nieokreślonym substancjom, z których jedna umiejscowiona jest blisko linii startowej chromatogramu (plama a) a druga poniżej spływu ksylozy (plama b).

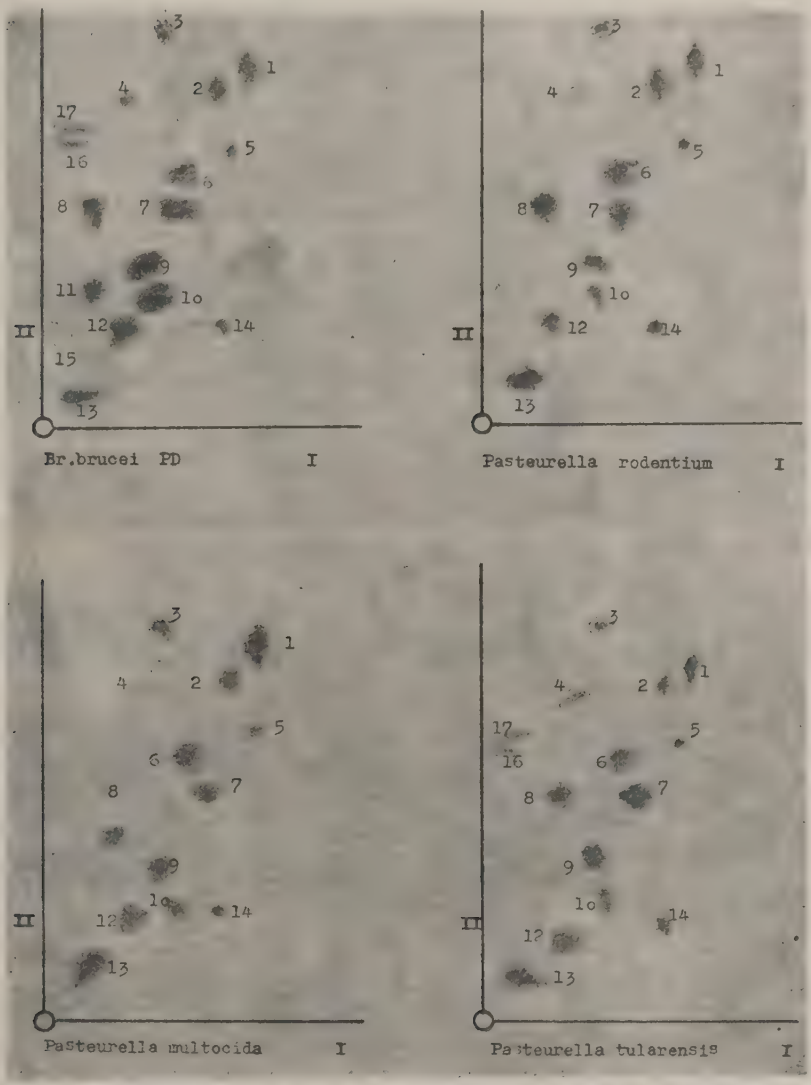
TABELA II

Hydrolizat frakcji białkowej sympleksów białkowo-cukrowych
Analyses of the hydrolysate of protein fraction of glicoproteide-symplexes

Aminokwasy Aminoacids	*Brucella brucei*					*Pasteurella*		
	bovis	*suis*	*melitensis*	*S - 19*	*PD*	*tularense*	*rodentium*	*multocida*
Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	±	±	±	±	±	±	±	±
Cystyna	–	–	–	–	–	–	–	–
Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikokol	+	+	+	+	+	+	+	+
Histydyna	±	±	±	±	±	±	±	±
Lizyna	+	+	+	+	+	+	±	+
Leucyna, izoleucyna, fenyloalanina	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrozyna	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptofan	–	–	–	–	–	–	–	–
Walina, metionina	+	+	+	+	+	+	+	+
Seryna	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+
Nieoznaczone Not determined	–	–	–	–	–	–	–	–

Na chromatogramie hydrolizatów sympleksów *Brucella* wyraźnie występuje 5 plam redukujących acetonowy roztwór azotanu srebra, z których cztery odpowiadają umiejscowieniem cukrom kontrolnym, glikozaminie, galaktozie, glikozie i mannozie (lub fruktozie i arabinozie). Plama umiejscowiona na wysokości spływu mannozy, w reakcji z aniliną zabarwia się brunatno, co przemawia za obecnością heksoz a nie pentoz w tej plamie. Plama piąta, oznaczona na chromatogramie literą „a", nie została określona z powodu braku czystych związków redukujących o tak niskim współczynniku R_F i bardzo małej ilości materiału badanego, co nie pozwoliło na przeprowadzenie badań własności fizyko-chemicznych tego związku po eluowaniu z chromatogramu. Biorąc pod uwagę dane z piśmiennictwa dotyczące chromatografii związków redukujących można by przypuszczać, że plama ta odpowiada umiejscowieniem jakiemuś z kwasów heksuronowych.

Różnice wielkości i intensywności zabarwienia plam związków redukujących w grupie *Brucella* pozwalają przypuszczać, że w składzie ilościo-



Rys. 5. Chromatogramy hydrolizatów frakcji białkowej *Brucella* i *Pasteurella*.
Fig 5. Chromatograms of hydrolysates of proteide fraction of *Brucella* and *Pasteurella*
Objaśnienia jak do rys. 4

wym, we wzajemnych stosunkach ilościowych poszczególnych cukrów tworzących wielocukrowiec, a może w ich położeniu przestrzennym, a więc w strukturze samego wielocukrowca (a nie w składzie jakościowym), tkwić może między innymi istota odrębności poszczególnych odmian: *bovis*, *melitensis*, *S-19* i *PD* pałeczek *Brucella brucei*.

Wielkość i intensywność zabarwienia plam na chromatogramach trzech związków redukujących, umiejscowionych na miejscu spływu glikozaminy, galaktozy i mannozy jest różna (tabela I).

Obrazy chromatograficzne frakcji cukrowej *P. tularense* i *P. multocida* wykazują duże podobieństwo. Pałeczki te zawierają więcej związków redukujących aniżeli *Brucella*. Chromatogramy hydrolizatu frakcji cukrowej tych pałeczek wykazują obecność dwu związków nie występujących u *Brucella*, które umiejscowieniem odpowiadają ksylozie oraz związkowi nieoznaczonemu o większym niż ksyloza współczynniku rozdziału (ryboza?).

Chromatogram hydrolizatu frakcji cukrowej *P. rodentium* wykazuje obecność tylko trzech wyraźnych plam, odpowiadających plamom „a", 3 i 4 hydrolizatów frakcji wielocukrowej *Brucella*, *P. tularense* i *P. multocida*, oraz nieznaczne zaciemnienie na wysokości spływu galaktozy (tabela I, rysunek 1).

2. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KATALIZY I UREAZY*

Huddleson (1942) stwierdził, że zjadliwość *Brucella* jest w pewnym stopniu skorelowana z aktywnością katalazy. Według niego *B. suis* zawiera największą ilość katalazy, *B. bovis* najmniej, zaś *B. melitensis* zajmuje miejsce pośrednie.

Brucella (faza *S*) hodowano na agarze wątrobowym skośnym przez 48 godzin w 37°. Bakterie zawieszano w 0,05-procentowym roztworze tryptozopeptonu w 0,5-procentowym NaCl uprzednio autoklawowanym i przesączonym na krótko przed użyciem (*pH* 6,9 - 7,00). Gęstość zawiesiny oznaczano według skali Browna, dobierając ją tak, aby ilość bakterii w 1 ml wahała się od $6{,}9 \cdot 10^8$ do $7{,}7 \cdot 10^8$. 5 ml zawiesiny przenoszono do kolby Erlenmayera, dodawano 15 ml 1/15 N H_2O_2. Kolbkę z zawiesiną przenoszono do trzęsawki i poddawano drganiom 120 na minutę przez 20 minut w 20 - 25°. Z wytrząsanej probówki pobierano 5 ml płynu, dodawano 3 ml H_2SO_4 rozcieńczonego wodą w stosunku objętościowym 4 ml stężonego H_2SO_4 na 1 ml H_2O, a następnie miareczkowano pozostałą ilość H_2O_2 0,1 N nadmanganianem potasu.

Aktywność katalazy przeliczano w stosunku do 100 ml 0,1 N $KMnO_4$. Wyniki podawano jako średnią trzech oznaczeń: w każdej serii oznaczeń robiono 6 prób kontrolnych.

Ureazę oznaczano przy pomocy próby z czerwienią fenolową (Chodkowski i Parnas, 1956). Skład podłoża: 4% mocznika, 4,8% $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$, 1,8% KH_2PO_4, 0,02% wyciągu drożdżowego, 0,002% czerwieni fenolowej, *pH* 6,8. Pożywkę sączono przez filtr Berkefelda. Do probówki aglutynacyjnej wlewano 1 ml zawiesiny *Brucella* (hodowla świeża o gęstości około 10^9 w 1 ml), a następnie wprowadzano 1 ml pożywki, wstawiano do łaźni wodnej o ciepłocie 37°. Następnie notowano czas po jakim wystąpiło różowe zabarwienie podłoża. *B. melitensis* i *B. bovis* wywołują zabarwienie różowe po 55 minutach, natomiast *B. suis* zmienia barwę podłoża już po kilku minutach.

Aktywność katalazy i ureazy badanych szczepów podaje sumarycznie tabela III.

---

* W badaniach nad ureazą udział brał mgr H. Hryniewicz.

TABELA III

Aktywność katalazy i ureazy badanych szczepów
Catalase and urease activity of examined strains

Odmiana Varietas	Aktywność katalazy* Catalase activity			Aktywność ureazy (w minutach) Urease activity (minutes)		
	Średnia average	od from	do to	Średnia average	od from	do to
B. bovis	57,8	14,3	77,6	53	2	150
B. bovis atypowa	69,1	64,5	74,0	78	2	150
B. suis	78,5	70,0	84,0	2	2	3
B. suis atypowa	69,7	57,2	78,7	3	2	4
B. melitensis	60,4	56,9	79,1	47	3	85

Szczepy o znanej dużej wirulencji dały następujące wyniki:

	Katalaza	Ureaza
Odmiana *bovis Nr 24*	65,9	32
odmiana *bovis Nr 554*	63,4	30
odmiana *suis Nr 1330*	84,0	3
odmiana *melitensis Nr 16*	79,1	85

Aktywność katalazy i ureazy szczepów niezjadliwych odmiany *bovis* wygląda następująco:

	Katalaza	Ureaza
S - 19 122 R	14,3	·
S - 19 122 S	21,5	2
BA	54,7	·
BA S	71,4	·
PD	42,7	110

Wbrew zapatrywaniom Huddlesona nie stwierdziliśmy zależności pomiędzy aktywnością katalazy a przynależnością odmianową lub zjadliwością badanych szczepów. Wykazują to wyraźnie dane zestawienia. Zależność taką spostrzegamy natomiast odnośnie aktywności ureazy, co zgodne jest z danymi innych autorów. Istotnie szczepy *B. suis* odznaczają się niską aktywnością ureazy. Szczepy *B. bovis* i *B. melitensis* natomiast wykazują dużą aktywność ureazy.

3. WŁASNOŚCI SEROLOGICZNE I ALERGICZNE SYMPLEKSÓW UZYSKANYCH Z *BRUCELLA*

A. W trakcie poszukiwania najbardziej aktywnego antygenu do odczynu wiązania dopełniacza, cechującego się dużą swoistością, uzyskano frakcję białkowo-wielocukrową (P a r n a s i S t ę p k o w s k i, 1949). Tabela IV przedstawia wyniki badań porównawczych, nad siłą antygenową różnych preparatów.

Z tabeli wynika, że frakcje wielocukrowe są najlepszymi antygenami do odczynu wiązania dopełniacza.

* W przeliczeniu na 100 ml 0,1 N $MKnO_4$.

Staraliśmy się (wspólnie z Łazugą) wprowadzić odczyn hemaglutynacji do diagnostyki brucelozy ludzi i zwierząt. Metodykę badań opracowano na podstawie metody Dubosa-Middlebrooka. Do opłaszczania krwinek użyto 4 antygenów otrzymanych z *Brucella* odmiany *bovis*: I. frakcję białkowo-cukrową, II. frakcję białkową, III. frakcję cukrową, IV. antygen *B. bovis* stosowany przy odczynie wiązania dopełniacza (wyciąg wodny).

Pierwsze trzy frakcje otrzymane zostały z hodowli *Brucella bovis*. Materiałem wyjściowym był acetonowy dezintegrat, z którego frakcję 1 (białkowo-cukrową) otrzymano drogą hydrolizy kwaśnej. Dezintegrat zadano 5-procentowym kwasem trójchlorooctowym i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godzin. Następnie roztwór odwirowano, osad odrzucono, płyn poddano 36-godzinnej dializie w obecności toluolu. Po dializie płyn zagęszczono w 40° pod zmniejszonym ciśnieniem (20 do 40 mm Hg) do 1/3 objętości początkowej. Zagęszczony płyn zadano 5-krotną objętością 98-procentowego etanolu. Po 24 godzinach oddzielono strącony osad od płynu przez wirowanie. Osad przemyto alkoholem, acetonem i eterem oraz wysuszono w eksykatorze próżniowym w 20°. Otrzymany biały proszek w wodnych roztworach daje dodatnie reakcje ogólne na białko i cukry (Piotrowski, Heller, Molisch). Proszek ten nazwano frakcją 1 białkowo-cukrową.

Frakcję II i III otrzymano z rozbicia frakcji białkowo-cukrowej, stosując łagodną kwaśną hydrolizę. Frakcję I zadano N/10 kwasem octowym w stosunku 1 : 100 i podgrzewano przez 4 godziny na wrzącej łaźni wodnej, po czym odwirowano. Osad przemyto wodą, alkoholem, acetonem i eterem, a następnie wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymany biały proszek po rozpuszczeniu daje silne reakcje na białko (biuretowa Piotrowskiego, Hellera, sulfosalicylowa) oraz słabą reakcję na węglowodany (Molischa). Osad ten nazwano frakcją II białkową.

Płyn zadano bezwodnym acetonem w stosunku 1 : 5 i po 24 godzinach odwirowano. Osad po przemyciu alkoholem, acetonem i eterem wysuszono w temperaturze 20° w eksykatorze próżniowym. Suchy proszek koloru kremowego rozpuszczony w wodzie daje silny odczyn Molischa na węglowodany i słaby na białka Piotrowskiego. Osad ten jest frakcją III, nazwaną cukrową.

Antygen stosowany do odczynu wiązania dopełniacza otrzymano w następujący sposób: 3 - 4-dniową hodowlę *Brucella* spłukano 10 ml 0,85-procentowego roztworu soli kuchennej; zawiesinę wstrząsano przez 24 godziny z perełkami szklanymi, po czym gotowano przez 20 minut na łaźni wodnej. Po ostudzeniu zawiesinę sączono przez azbest; płyn o bursztynowym zabarwieniu po wymiareczkowaniu używano do odczynu wiązania dopełniacza.

Tabela V przedstawia wyniki odczynu hemaglutynacji z różnymi antygenami (I, II, III i IV). Wyniki te świadczą, że antygen używany do odczynu wiązania dopełniacza wywołuje hemaglutynację z surowicami dodatnimi w wysokich mianach: 1/64, 1/128, natomiast sympleksy o własnościach antygenowych (I, II, III) wywołują odczyn hemaglutynacji w niskich mianach: 1/8, 1/16, 1/32, albo dają wyniki ujemne. Antygen stosowany w odczynie wiązania dopełniacza (IV) wywołuje jednak zjawisko hemaglutynacji również z surowicami ujemnymi (lub co najwyżej wątpliwymi) w mianach 1/32, 1/64 i wyższych. Fakty te wskazują na nieswoistość odczynu hemaglutynacji przy użyciu na pozór bardzo czułego antygenu (IV). Antygeny I, II i III zachowują się z surowicami ujemnymi swoiście.

Czułość i swoistość odczynu hemaglutynacji przy brucelozie zależy w głównej mierze od antygenu używanego do uczulenia krwinek. Najlepsze wyniki otrzymano przy użyciu frakcji zwanej białkowo-wielocukrową. Najmniej swoisty okazał się antygen IV używany do odczynu wiązania dopełniacza (wyciąg wodny *Brucella*). Frakcja białkowa i cukrowa, uzyskane przez nas, okazały się mało czułe i mało swoiste. Prawdopodobnie oczyszczanie antygenu powoduje utratę swoistości.

Odczyn hemaglutynacji może być zatem użyty do diagnostyki brucelozy jako odczyn uzupełniający odczyn Wrigtha i odczyn wiązania dopełniacza.

Starano się również zastąpić alergen komórkowy preparatami chemicznymi. Wykonano w tym celu próby porównawcze z bruceliną *PS* i *PD* oraz poszczególnymi frakcjami uzyskanymi z *Brucella*. Do badań użyto frakcji białkowo-wielocukrowej, wielocukrowej i frakcji używanej do odczynu wiązania dopełniacza (otrzymywanych tak, jak do odczynu hemaglutynacji).

Frakcja II (białkowa) okazała się dobrym antygenem i wywoływała dodatnie odczyny serologiczne trwające przez 8 tygodni. Frakcja I (biał-

TABELA IV

Aktywność preparatu z odmiany *bovis* w odczynie wiązania dopełniacza
Antigenic characteristics of *B. bovis* preparations in complement fixation test

Sposób otrzymania preparatu The method of preparation	Stopień rozcieńczenia antygenu w % Dilution of the antigen per cent								
	0,5	1	3	5	8	10	15	20	25
Rozbijano mechanicznie, komórki odrzucano Mechanical desintegration, supernatant fluid	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Rozbijano przez zamrażanie i odtajanie, komórki odrzucano Freezing and thawing, supernatant fluid	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Zawiesina wyjaławiana w autoklawie (115°) przez 20 minut i sączona Autoclaved (115°) for 20' and filtered	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa I Polysaccharide fraction I	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa II Polysaccharide fraction II	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa III Polysaccharide fraction III	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja białkowa I Protein fraction I	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Frakcja białkowa II Protein fraction II	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Abortyna radziecka Abortine	–	–	–	–	–	+	++	++	+++

Doświadczenia przeprowadzono wspólnie z S. Stępkowskim.

TABELA V

Odczyn hemaglutynacji z różnymi antygenami *Brucella* odmiana *bovis*
Hoemagglutination test — various antigens of *Brucella* variant *bovis*

Nr badanej surowicy bydlęcej Serum No	Odczyn Wrighta Agglutination test (titer)	Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation test	Odczyn hemaglutynacji Hoemagglutination test frakcja - fraction			
			wielocukrowo-białkowa glicoproteide	białkowa proteide	wielocukrowa polysaccharide	antygen do O.W.D. antigen for rutine complement fixation test
2	1/200 +	−	−	−	−	1/16
3	1/100 +	+	1/16	1/16	1/16	1/28
4	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/32
5	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/32
6	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/8
7	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/32	1/32
8	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/128
9	1/100 ±	+	−	−	−	1/16
11	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/64
13	1/200 ±	−	1/8	1/8	1/16	1/128
14	1/800 +	+	1/32	−	1/8	1/32
15	1/200 +	−	−	−	1/8	1/32
16	1/100 +	+	1/16	1/8	1/16	1/32
17	1/200 ±	−	1/8	1/8	1/8	1/16
19	1/200 ±	−	1/8	1/8	1/8	1/128
20	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/32
21	1/400 ±	−	−	−	−	1/16
22	1/200	+	1/8	−	1/8	1/32
23	1/200 +	−	1/16	1/8	1/32	1/32
24	1/200 ±	−	1/8	−	−	1/32
26	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/16	1/128
27	1/200 +	−	1/8	1/8	1/8	1/32
28	1/800 ±	−	1/8	1/8	1/8	1/64
29	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/16	1/64
30	1/800 +	−	1/8	1/8	1/8	1/32
31	1/100 +	−	1/8	1/8	1/8	1/32
32	1/800 +	+	1/16	1/8	1/16	1/64
33	1/800 +	+	1/16	1/16	1/32	1/128
34	1/100 +	−	1/8	1/8	1/8	1/32
35	1/200 ±	−	1/8	1/8	1/8	1/64
36	1/200 +	+	1/8	1/8	1/16	1/32
37	1/100 +	+	1/8	1/8	1/8	1/32
38	1/400 +	+	1/8	1/8	1/16	1/64
43	1/400 +	+	1/8	1/8	1/16	1/64
44	1/200 +	+	1/8	1/8	1/8	1/128
45	1/400 +	−	−	−	1/8	1/32

Nr badanej surowicy bydlęcej Serum No	Odczyn Wrighta Agglutination test (titer)	Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation test	Odczyn hemaglutynacji Hoemagglutination test frakcja - fraction			
			wielocukrowo-białkowa glicoproteide	białkowa proteide	wielocukrowa polysaccharide	antygen do O.W.D. antigen for rutine complement fixation test
47	1/25 +	+	—	—	1/8	1/64
48	1/200 +	—	1/8	1/8	1/8	1/64
49	1/50 +	—	1/8	1/8	1/8	1/128
51	1/100 +	—	1/8	1/8	1/8	1/16
52	1/200 +	—	1/8	1/8	1/16	1/32
53	1/100 +	—	1/8	1/8	1/8	1/32
56	1/100 ±	—	1/8	1/8	1/16	1/32
57	1/800 ±	+	1/16	1/8	1/8	1/64
58	1/800 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/128
59	1/800 +	+	1/8	1/8	1/8	1/32
63	1/100 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/32
65	1/100 ±	—	1/8	—	—	1/8
Surowice kontrolne — Control sera						
71	—	—	—	—	—	1/16
72	—	—	—	—	—	1/16
73	—	—	—	—	—	1/16
74	—	—	—	—	1/8	1/16
75	—	—	—	—	—	1/16
76	—	—	—	—	—	1/16
77	—	—	—	—	1/8	—
78	—	—	—	1/8	1/8	1/16
79	—	—	—	1/8	1/8	1/16
80	—	—	—	—	—	1/32

Doświadczenia przeprowadzono wspólnie z K. Łazugą.

kowo-cukrowa) jest słabo antygenowa (ujemny wynik odczynu wiązania dopełniacza i szybsze — do 5 tygodni — wygasanie odczynu zlepnego).

Frakcja III (wielocukrowa) jest najsłabszym antygenem.

Po podskórnym wprowadzeniu uczulonym królikom tych frakcji oraz bruceliny *PS* i *PD* stwierdzono, że wyodrębnione sympleksy (frakcje I, II, III i IV) ustępują czułością brucelinie *PS* i *PD* i nie nadają się do odczynu Burneta.

Następnie sporządzono jeszcze dwie frakcje alergenowe, mianowicie *M* i *MM*. Przemytą masę bakteryjną zadawano 200-krotną objętością 5-procentowego kwasu octowego, pozostawiając w temperaturze 20° przez 24 godziny, gotowano przez 10 minut, a następnie wirowano. Otrzymany

płyn oddzielano od osadu, nastawiano na *pH* 4 i zadawano acetonem w stosunku 1 : 1. Po 48 godzinach wirowano, otrzymany osad przemywano i wysuszano. Suchy proszek rozpuszczano w jałowej wodzie destylowanej o *pH* 7 z dodatkiem 0,5-procentowego fenolu. Tak otrzymany roztwór stanowił alergen *M*.

Osad po gotowaniu z kwasem octowym zadawano N/10 HCl, gotowano przez 25 minut pod chłodnicą zwrotną, a następnie wirowano. Płyn z nad osadu doprowadzano do *pH* 4,5. Otrzymano przy tym osad, który przemywano acetonem i suszono w suszarce w 80°. Suchy proszek rozpuszczano w jałowej destylowanej wodzie z dodatkiem 0,5% fenolu. Tak otrzymany roztwór stanowił alergen *MM*.

Wyniki ilustruje tabela VI.

TABELA VI

Odczyny alergiczno-skórne u królików zakażonych brucelą
Allergic skin test in infected rabbits

Nr królika Rabbit N°	Brucelina *PS* i *PD*	P.E.B.A.*	Alergen *M*	Alergen *MM*
1	+	–	–	–
2	++	–	–	
3	++	–	–	–
4	+	+–	–	–
5	+	+–	–	–
6	+++	+ –	+	++
7	++	–	–	
8	+	–	–	–
9	+–	–	–	–
10	–	–	–	–
11	++	+	–	–
12	++	–	–	–
13	+	+	–	–
14	–	–	–	–
15	+	+	–	–
16	+–	+–	–	–
17	+	–	–	–
18	+–	+–	–	–

* Alergen duński Pluma i Ottosena, odpowiadający preparatowi Huddlesona.

Widoczne jest, że najczulszym alergenem jest brucelina *PD*, co potwierdziły dalsze eksperymenty tu nie referowane oraz badania kliniczne.

Badania te są nadal kontynuowane.

LITERATURA

1. Chodkowski A. i Parnas J., 1956: Badania nad odmianami pałeczek *Brucella* występującymi w Polsce. *Annales UMCS, S DD.*, w druku.
2. Dambovicenau A., Barber C., Marinov I., 1938: Complete antigen of the *Brucella*, Chemical characteristics. *Compt. rend. soc. biol.*, **127** : 736.
3. Dubrowska I. I., 1950: Antigieny *Brucella suis*. Wydielenije, oczistka i chimiczeskaja charakteristika, *Biochimia*, **15** : 490.
4. Dubrowska I. I., 1951: Gidroliz antigiennogo kompleksa *Brucella suis* i chimiczeskaja priroda komponientow. *Biochimia*, **16** : 41.
5. Dubrowska I. I., 1954: Srawnitielnoje chimiczeskoje isledowanije antigienowych kompleksow brucell raznych tipow. *Biochimia*, **19** : 137.
6. Huddleson I. F., 1942: Brucellosis in Man and Animals, New York.
7. Huston R. C., Huddleson I. F., Hershey A. D., 1934: The chemical separation of some cellular constituents of the *Brucella* group of microorganisms. *Michig. Coll. Agr. Expt. Sta. Techn. Bull.* N° 137.
8. Lisbonne H., Monnière P., 1936: Some properties of the completé (Boivin) antigen of *Br. melitensis*. *Compt. rend. soc. biol.*, **123** : 1114.
9. Opieńska-Blouth J., Madecka-Borkowska I., 1950: Rozdzielanie cukrów o zbliżonym współczynniku *R* z mieszanin metodą chromatografii bibułowej. *Acta Physiol. Polon.*, **1** : 134.
10. Mikulaszek E., 1951: Immunologicznie czynne wielocukrowce, Kraków.
11. Miles A. A., Pirie N. W., 1939: The properties of antigenic preparations from *Brucella melitensis*. I. Chemical and physical properties of bacterial fractions. *Brit. J. Exp. Path.*, **20** : 63, 83, 109.
12. Miles A. A., Pirie N. W., 1939: The properties of antigenic preparations from *Brucella melitensis*. IV. Hydrolysis of the formamino linkage. *Biochem. J.*, **23** : 1708, 1716.
13. Parnas J., Stępkowski S., 1949: Badania rozpoznawcze w przebiegu brucellozy w Polsce. *Annales UMCS, S DD*, **2** : 147.
14. Parnas P., Łazuga K., Mierzejewski T., 1953: Próba zastosowania odczynu hemaglutynacji w diagnostyce brucellozy. *Annales UMCS, SD*, **5** : 25.
15. Parnas J., Mierzejewski T., Feltynowski A., Łazuga K., 1956: Badania porównawcze nad właściwościami pałeczek: *Pasteurella tularensis, Pasteurella multocida, Pasteurella rodentium* i *Brucella brucei*. *Annales UMCS, SD*, w druku.
16. Paterson J. S., Pirie N. W., Stableforth A. W., 1947: Protective antigens isolated from *Br. abortus*, *Brit. J. Exp. Path.*, **28** : 223.
17. Penell R. B., 1950: Brucellosis. The chemistry of *Brucella* organisms, Washington.
18. Renoux-Machaffey, 1955: World Health Organisation. Bull. **12**.

J. Parnas and *T. Mierzejewski*

BIOCHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON *BRUCELLA*

Summary

Strains of *Brucella brucei var. bovis (B. abortus), suis, melitensis* and of *Pasteurella tularense, P. rodentium* and *P. multocida* were studied.

The polysaccharide-protein symplexes were extracted from the bacterial cells, hydrolysed and examined by paper chromatography.

The aminoacid composition of proteide fraction of symplexes isolated from *Brucella* and *Pasteurella* cells was similar (table II, fig. 4, 5).

There was noted some differences in polysaccharide fractions of examined variants of *Brucella* and of *Pasteurella* strains (table I, fig. 3).

In connection with the observations of Huddleson on the correlation between the virulence and the activity of catalase and urease in the *Brucella* strains — this activity was studied in strains of *B. abortus*, *B. bovis* and *B. suis*. No correlation between virulence and catalase or urease activity was observed (table III). Nevertheless there was some difference in the ability to decompose urea between *B. suis* on one side and *B. abortus* and *B. melitensis* on the other side.

The antigenic properties of isolated fractions were also examined. The polysaccharide fraction was shown to be a hapten, specially suitable for complement fixation test (table IV).

The polysaccharide-protein symplex was antigenic and good results were obtained with it in haemagglutination test (table V).

These preparations were not suitable for allergic skin test in brucellosis (table VI).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 371 - 376

J. Parnas i *A. Chodkowski*

ZMIENNOŚĆ PAŁECZEK *BRUCELLA* KOLEKCJI KRAJOWEJ

Z Zakładu Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy
i Higieny Wsi w Lublinie

Wpłynęło dnia 5 maja 1956 r.

W roku 1958 upłynie pół wieku od chwili, kiedy Julian Nowak opublikował wyniki swych pięknych prac na łamach Annales d'Institut Pasteur. Była to pierwsza polska praca dotycząca *Brucella*. Nawiązując do znaczenia dorobku naukowego tego znakomitego badacza polskiego pragniemy uważać przedstawione tu wyniki naszych badań za wyraz chęci kontynuowania jego trudu.

Zebrana po raz pierwszy w Polsce kolekcja szczepów *Brucella*, obejmująca 121 szczepów krajowych i 22 zagranicznych, została poddana analizie mikrobiologicznej.

WŁAŚCIWOŚCI MORFOLOGICZNE I WZROSTOWE SZCZEPÓW KRAJOWYCH

Są to drobne, gramujemne, owalne lub nieco wydłużone pałeczki, 0,6 - 1,5 μ długości i 0,3 - 0,5 μ szerokości. *Brucella* występują w mikroskopie elektronowym w postaci jajowatych komórek, oddzielnie rozmieszczonych w polu widzenia (fot. 1). Zauważono różnice w kształcie i wielkości między pałeczkami: *Brucella, Pasteurella tularense, P. multocida* i *P. rodentium*. Zbadane szczepy krajowe nie wykazały obecności otoczek.

Między szczepami w fazie *S* i *R* spostrzegaliśmy pewne różnice morfologiczne. Jajowate pałeczki fazy *S* są ułożone pojedynczo, barwią się silnie. Pałeczki fazy *R* są wydłużone, czasem układają się w krótkie łańcuszki lub nitki i barwią się słabiej. Pałeczki fazy *S* układają się w preparatach z hodowli stałej i płynnej w duże zbite masy, w odróżnieniu od fazy *R*, której pałeczki układają się luźniej. Ruch brownowski pałeczek fazy *S* jest żywszy aniżeli fazy *R*. Pałeczki fazy *M* (śluzowate) nie wykazują śluzowatych otoczek, natomiast układ ich jest podobny do układu w fazie *R*.

Wśród badanych przez nas szczepów 22 rosły tylko przy zwiększonym cząsteczkowym ciśnieniu CO_2, mimo że są to szczepy przechowywane w muzeum przez okres od kilku miesięcy do kilku lat.

Na podłożach stałych badane szczepy wykazują dużą zmienność, co omówione będzie dalej. Spotyka się kolonie półkuliste, wypukłe, okrągłe, o równym brzegu, przeświecające, homogenne, lub lekko ziarniste.

Potwierdziliśmy w czasie tych badań wyniki Zdrodowskiego (1948), dotyczące różnic między fazami *S* i *R Brucella*.

METODYKA BADAŃ

Metoda badania kolonii *Brucella* według Henry'ego (1933) (w modyfikacji własnej): Stosowano duże płytki Petriego (najmniej 12 cm średnicy) z podłożem agarowym Brauna. Podłoże lekko wysuszano (nie więcej niż 10 minut) w temperaturze 37°. Oczko ezy hodowli z bulionu wątrobowego przenoszono na agar Brauna, rozprowadzając materiał kolankiem zgiętej pipetki pasteurowskiej dokładnie po całej powierzchni agaru. Płytki wstawiano do cieplarki (37°), układając je dnem na dół. Po 24 - 48 godzinach obserwowano płytki pod lupą binokularną oświetlając je kolejno dwoma lampami. Jedną lampkę umocowano na stelażu w odległości około 25 cm od stolika lupy tak, aby snop światła padał z góry na kolonie pod kątem 45°. W takim oświetleniu widoczne są kształt, powierzchnia, połysk, barwa i konsystencja kolonii. Drugą lampkę umieszczano w tej samej odległości u dołu, tak aby oświetlała obiekt pod kątem 45°. W takim oświetleniu zarysowują się wyraźnie różnice struktury kolonii *S, R, SR, M* itd. Następnie barwiono kolonie metodą Henry-Brauna i oglądano okiem nieuzbrojonym oraz pod lupą.

Kolonie *S* mają barwę niebieską, zielonkawoniebieską lub szaroniebieską, są wilgotnawe, błyszczące, a powierzchnia ich jest gładka.

Kolonie fazy *R* są nieprzejrzyste, matowe, konsystencji suchej i kruchej, barwy białawożółtej, o brzegu równym; czasem na pożywce nadmiernie wilgotnej brzeg jest poszarpany, wykazując klinowate wycinki.

Kolonie *SR*, z wyglądu podobne do kolonii *S*, dają zjawisko autoaglutynacji.

Kolonie *RB* mają charakterystyczną barwę kasztanowobrązową; są mniejsze od kolonii *S* i *R*, czasem śluzowate (faza *M*).

W koloniach fazy *M* wyróżniają niektórzy dysocjanty M_{s1}, M_{s2}, M_{s3}.

METODY RÓŻNICOWANIA KOLONII FAZY *S* I *R*

Z uwagi na duże znaczenie różnicowania faz *S* i *R* poddaliśmy analizie porównawczej różne metody.

Zastosowano metodę termoaglutynacji (B u r n e t, 1928). Odczyn zlepny z fuksyną zasadową di Aichelburga, aglutynację akryflawinową (trypaflawinową) (A l e s s a n d r i n i - S a b a t u c c i, 1931), aglutynację riwanolową Zagrodzkiego i Zylbertala (Z a g r o d z k i 1938), aglutynację kwaśną w płynach buforowych według Clarka i Lubsa, próbę według Henry'ego i Brauna, polegającą na barwieniu całych kolonii *in situ* roztworem fioletu goryczkowego.

W h i t e i W i l s o n (1951) zbadali przydatność innych barwników. Okazało się, że safranina 0 nadaje się również do różnicowania faz. Kolonie *S* są niezabarwione lub mają barwę szaroróżową. Kolonie *R* są barwy różowopomarańczowej. Eozyna, zieleń brylantowa, fuksyna kwaśna, zieleń metylowa, czerwień kongo, zieleń malachitowa i czerwień sudanu — są mniej przydatne.

Szczepy kolekcji krajowej badano przy pomocy zmodyfikowanej metody Henry'ego, metody Brauna i metody Burneta. Każdy szczep badano w wysiewach z hodowli muzealnych oraz po przepasażowaniu przez organizm świnek morskich i myszy. Szczepy wyosobniano z narządów tych zwierząt przy użyciu moździerzyków Griffitha.

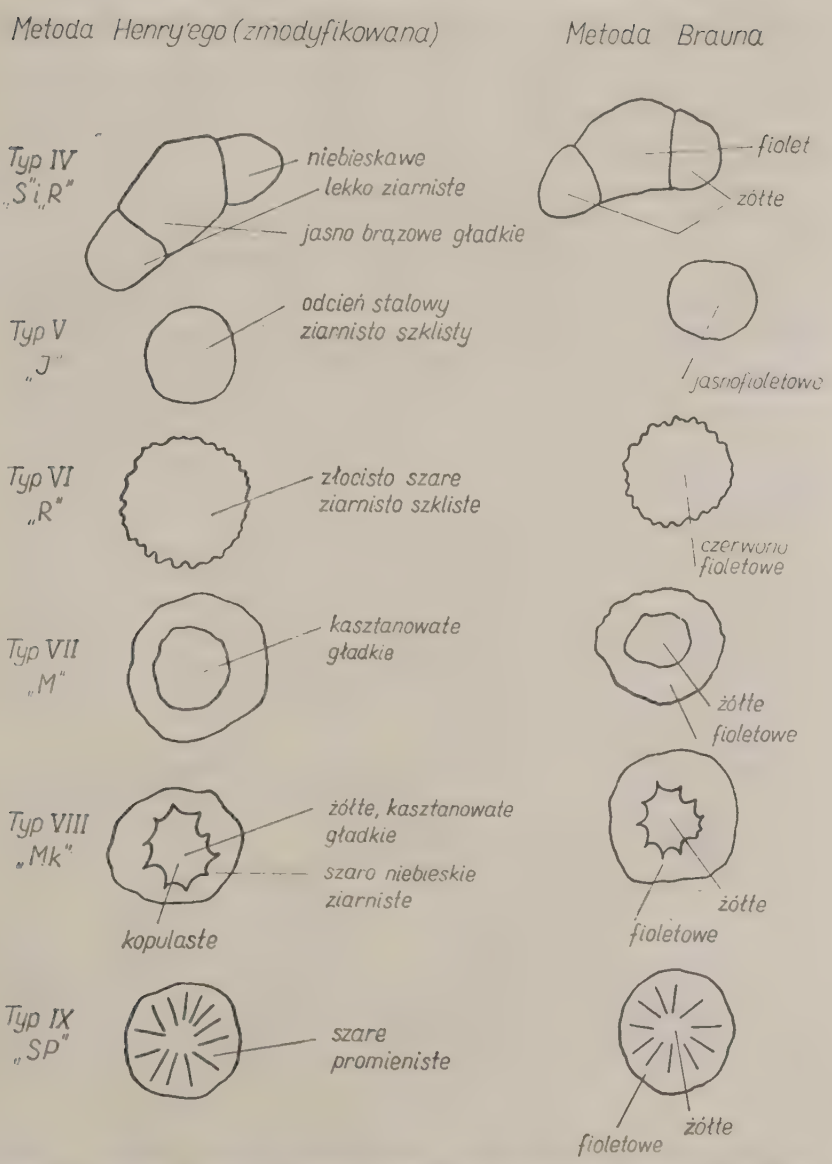
WYNIKI BADAŃ

Wśród badanego materiału znaleziono 9 typów kolonii (rys. 1, fot. 2 - 4), a mianowicie:

Typ I: Kolonie duże, o powierzchni gładkiej. Barwa stalowosinawa przy obserwacji metodą Henry'ego i jasnożółta — metodą Brauna. Termoaglutynacja nie występuje (kolonie fazy *S*).

Typ II: Kolonie okrągłe, o powierzchni gładkiej lub lekko ziarnistej, brzegu równym, odcieniu niebieskawoszarym (metoda Henry'ego), barwa żółta, nakrapiana fioletowo (metoda Brauna). Słaby osad zlepny przy termoaglutynacji (kolonie *Sr*).

Typ III: Kolonie duże, środek o powierzchni gładkiej, barwy szarawej i wał ziarnisty o odcieniu stalowosinym (metoda Henry'ego) lub środek żółtofioletowy, wał jasnofioletowy (metoda Brauna). Dodatni odczyn ter-



Rys. 1. Schematy kolonii różnych typów badanych według metody Henry'ego i Brauna.

Fig. 1. Colony types of *Brucella* as observed in the methods of Braun and Henry (schematically)

moaglutynacji. Wał kolonii ma czasem charakter nieco śluzowaty (kolonie fazy S^{rm}).

Typ IV: Kolonie mieszane, owalne spłaszczone, o powierzchni szarożółtej i ziarnistej (*R*) jednej kolonii oraz gładko niebieskawej (*S*) drugiej kolonii (metoda Henry'ego). Przy zastosowaniu metody Brauna jedna z kolonii zabarwia się żółto (*S*), druga fioletowo (*R*). W odczynie termoaglutynacji obfity osad i utrzymujące się zmętnienie (kolonie typu *SR*).

Typ IV$_1$: Kolonie o wyglądzie i kształcie nie opisanym dotąd w piśmiennictwie, niepodobne do kolonii *Brucella*. Niewątpliwie obserwowano już je nieraz, lecz zaliczano do saprofitów. Bakterie z tych kolonii wykazują wszystkie właściwości biochemiczne i serologiczne *Brucella*. Część środkowa kolonii jest owalna lub okrągła, o powierzchni gładkiej, odcieniu żółtym, otoczona płaskim wałem o brzegach nierównych, budowie ziarnistej, odcieniu stalowosinym (metoda Henry'ego). Kolonia przypomina kształtem amebę. Przy zastosowaniu metody Brauna część środkowa ma zabarwienie żółte, zaś zewnętrzna — fioletowe. W odczynie Burneta stwierdza się osad zlepny i zmętnienie płynu powyżej osadu (faza *RS*).

Typ V: Kolonie typu przejściowego, małe, o odcieniu stalowym, powierzchni ziarnisto-szklistej (metoda Henry'ego) lub jasnofioletowe (metoda Brauna). Ziarnisto-szklisty charakter powierzchni kolonii przyrównują autorzy amerykańscy do grudki drobno sproszkowanego szkła. Odczyn termoaglutynacji — ujemny (typ pośredni *I*).

Typ VI: Małe, pojedynczo ułożone kolonie o brzegu poszarpanym, powierzchni ziarnisto szklistej (jakby drobno sproszkowane szkło), odcieniu złocistoszarym (metoda Henry'ego) lub czerwonofioletowym (metoda Brauna). Odczyn termoaglutynacji wybitnie dodatni (typowa faza *R*).

Typ VII: Spotykany u niektórych szczepów odmiany *suis*. Duże kolonie, składające się z części środkowej, okrągłej i gładkiej, z odcieniem kasztanowatym i wałem śluzowatym (metoda Henry'ego). Przy obserwacji metodą Brauna środek jest koloru żółtego, zaś wał fioletowego. Termoaglutynacja ujemna (typ *M*).

Typ VIII: W piśmiennictwie nie spotkaliśmy opisów ani fotografii tych kolonii, które obserwowaliśmy u odmiany *bovis* trzykrotnie. Kolonie składają się z części obwodowej o powierzchni ziarnistej i odcieniu szaroniebieskawym i z części środkowej, która wznosi się ku górze kopulasto i jest odgraniczona od części obwodowej charakterystycznymi kopułami. Całość kolonii przypomina wyrosłą babkę. Przy metodzie Brauna część środkowa ma barwę żółtą (*S*), część obwodowa fioletową (*R*). Termoaglutynacja ujemna (faza M_k).

Typ IX: Kolonie o charakterystycznym wyglądzie promienistym, opisane już przez Huddlesona. Są one średniej wielkości o odcieniu szarawym, z wyraźnymi prążkami idącymi od środka ku obwodowi (metoda Henry'ego). Przy zastosowaniu metody Brauna kolonie są zabarwione żółto, zaś promienie fioletowo. Słaby odczyn termoaglutynacji (faza S^p).

LITERATURA

1. Alessandrini A., Sabatucci M., 1931, *Annali d'igiene* **41** : 29.
2. Burnet W., 1928, *Arch. Inst. Pasteur, Tunisie*, **3** : 128.
3. Henry B. S., 1933, *J. inf. Dis.*, **6** : 374.
4. Nowak J., 1908, *Ann. Inst. Pasteur*, **6** : 541.

5. White F. G., Wilson F. B., 1951, *J. Bact.*, **61** : 239.
6. Zagrodzki K., 1938, *Pamiętn. PINGW*, Puławy, **2** : 14.
7. Zdrodowski P. F., 1948: Brucelloz., Medgiz, Moskwa.

J. Parnas and *A. Chodkowski*

COLONIAL VARIATION IN *BRUCELLA*

Summary

About 160 strains of *Brucella* isolated in Poland were examined in respect of colonial variation.

Nine types of colonies were observed and two new colony forms not previously noticed (type IV and IX) were described (Fig. 1, phot. 2 - 4).

The methods of examination of colonial variation in *Brucella* were compared and the significance of this variation was discussed.

Tablica I

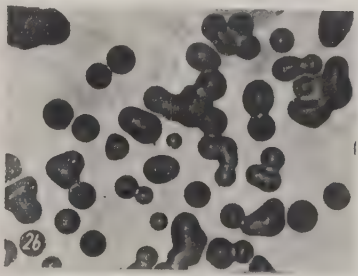
Fot. 1. *Brucella brucei v. bovis*
Fot. 2. Zmienność *Brucella*. Kolonie S (z lewej strony), R (z prawej strony).
Fot. 3. Zmienność pałeczek *Brucella*. Kolonie S i R.
Fot. 4. Zmienność pałeczek *Brucella*. Kolonie typu I (S) i typu III (S^{im}).

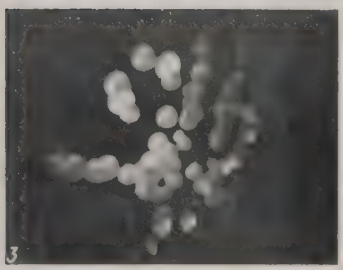
Table I

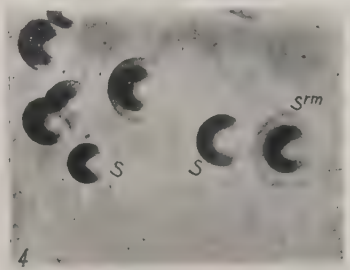
Phot. 1. *Brucella brucei v. bovis*
Phot. 2. *Brucella*. Smooth colonies (on the left) and rough (on the right)
Phot. 3. *Brucella*. Smooth and rough colonies
Phot. 4. *Brucella*. Colonies type *I* (*S*) and type *III* (S^m)

1

2a


2b


3


S
S
Srm
4

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 377 - 384

N. Balicka i *M. Trzebiński*

AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA I OBECNOŚĆ WITAMINY B_2 W GLEBIE

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 29 kwietnia 1956 r.

Przeprowadzając tzw. mikrobiologiczną charakterystykę gleby opieramy się najczęściej na oznaczeniu ogólnej ilości drobnoustrojów lub pewnych ich grup fizjologicznych. Nie negując wartości tej metody, zdajemy sobie równocześnie sprawę z jej niedoskonałości. Dlatego też w naszej pracowni próbowaliśmy uzupełnić tę charakterystykę przez oznaczenie aktywności enzymatycznej gleby i obecności w niej witaminy B_2. Oznaczenie innych witamin zostało zaniechane ze względu na zbyt duże trudności techniczne. Uzyskane wyniki zestawiono z ogólną ilością drobnoustrojów w tych samych próbkach gleby, starając się znaleźć pomiędzy nimi jakąś współzależność.

Dane z literatury z zakresu enzymatyki gleby są sprzeczne. Niektórzy autorzy stwierdzają korelację pomiędzy aktywnością enzymów a ogólną ilością drobnoustrojów (Seegerer, 1953) oraz własnościami gleby, np. *pH*, zawartością łatwo dostępnej substancji organicznej (Scheffer, 1953). Autorzy tych prac zastrzegają się przed uogólnieniem i traktowaniem „siły enzymatycznej" gleby jako wykładnika jej żyzności. Inni natomiast nie znajdują zależności pomiędzy ogólną ilością drobnoustrojów a aktywnością takich enzymów jak np. sacharazy (Drobnik i Seifert, 1955). Stwierdzono też, że zmiany aktywności różnych enzymów w tych samych glebach nie przebiegają równolegle (Drobnik, 1955). Wykazano również istnienie zależności pomiędzy ogólną ilością drobnoustrojów a zawartością ryboflawiny i biotyny w glebie (Krasilnikow, 1952). Przy liczniejszej mikroflorze znajdowano większe ilości tych witamin; Schmidt i Starkey (1951) stwierdzili większą ilość ryboflawiny w ściółce i warstwie próchnicznej gleb leśnych niż w glebie uprawnej, co kojarzą ze stopniem mineralizacji substancji organicznej w tych glebach. Zaobserwowali też, że ryboflawina i kwas pantotenowy, wprowadzone do gleby sterylnej, zanikały po zaszczepieniu jej glebą niesterylną, co wskazywałoby na zużycie tych witamin przez drobnoustroje.

Praca niniejsza pomyślana została przede wszystkim jako próba metodyczna. Celem jej było sprawdzenie przydatności metod oznaczania niektórych enzymów oraz przystosowanie metody oznaczania ryboflawiny do swoistego substratu, jakim jest gleba. Opierając się na pracach Hofmanna (1952), Schmidta (1953), Niggemanna (1953) opracowano metodykę oznaczania sacharazy, ureazy i proteazy w glebie.

Do oznaczania stosowano próbki gleby „powietrznie suchej", ponieważ enzymy w komórkach drobnoustrojów lub poza nimi czynne są przez stosunkowo długi okres czasu. Od chwili pobrania próbki gleby do jej badania upływało zazwyczaj kilka dni. Użycie gleby w stanie naturalnym, co należy uznać za najwłaściwsze, natrafiało na trudności związane z koniecznością dokładnego oddzielenia szczątków roślinnych, żwiru itp. Odważoną próbkę przesianej gleby poddawano działaniu toluenu w celu zniszczenia (lub zahamowania rozwoju) drobnoustrojów, po czym zadawano odpowiednim buforem i — zależnie od rodzaju próby — roztworem sacharozy, żelatyny lub mocznika.

Mierzenie aktywności sacharazy opierało się na określeniu ilości cukru rozłożonego w glebie pod działaniem tego enzymu w przeciągu 24 godzin w temperaturze 37°. Pozostały nierozłożony cukier oznaczano jodometrycznie.

Oznaczanie aktywności ureazy polegało na mierzeniu ilości amoniaku powstałego z mocznika w badanej próbie gleby. Amoniak oznaczano kolorymetrycznie, po upływie 48 godzin w temperaturze 37°. Jest to modyfikacja metody H o f m a n n a opracowana przez Trzebińskiego.

Aktywność proteazy określano na podstawie pomiarów szybkości rozpuszczania żelatyny, przy pomocy której zestalano próbki gleby. Im więcej enzymów, tym szybciej następuje upłynnienie żelatyny.

Oznaczenie ryboflawiny przeprowadzono metodą mikrobiologiczną (Methods of Vitamins Assay, 1947), używając jako organizmu testowego *Lactobacillus casei*, hodowanego na pożywce cukrowej wzbogaconej w ciała wzrostowe, a nie zawierającej ryboflawiny. Do pożywki tej wprowadzono różne ilości sterylnego wyciągu badanej gleby i zaszczepiono świeżą kulturą *Lactobacillus casei*. Po odpowiednim określeniu czasu inkubacji oznaczano wytworzony kwas mlekowy, a z jego ilości, przez porównanie ze standartem, określano ilość wytworzonej ryboflawiny. Metoda ta jest niezwykle czuła i pozwala na oznaczanie tysięcznej części γ witamin.

Próby prowadzono przez 3 lata, na różnych obiektach:

1. W 1953 r. na kilku rodzajach gleb: a) madzie piaszczystej — bardzo ubogiej, b) madzie ciężkiej — średnio żyznej, c) ogrodowej — żyznej.

2. W 1954 r. na glebie jednego typu (less), ale pozostającej w różnym użytkowaniu długotrwałym: a) pole uprawne zasiane żytem, b) łąka.

3. W 1955 r. na glebie jednego typu i w jednakowym użytkowaniu polowym — zasianej żytem. Różnica polegała tylko na odmiennych przedplonach.

Taki wybór obiektów został podyktowany zamiarem wypróbowania nie tylko samej metodyki oznaczeń, ale również przydatności tych metod do charakterystyki podobnych gleb i wykrywania stosunkowo drobnych różnic, wywołanych np. przez gospodarkę człowieka.

WYNIKI BADAŃ

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach I - VI.

Wyniki obserwacji na trzech rodzajach gleb, różniących się znacznie własnościami fizycznymi i produkcyjnymi (Tąb. I), pozwalają przypuszczać, że pomiędzy ogólną ilością drobnoustrojów, aktywnością sacharazy, zawartością ryboflawiny i substancji organicznej istnieje pewna korelacja, aczkolwiek różnice pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami na różnych glebach są bardzo niewielkie, zwłaszcza między madą ciężką i glebą ogrodową.

Analiza gleby tego samego typu, ale pozostającej w różnym użytkowaniu (polowym i łąkowym) dała wyniki następujące (Tab. II): ilość drobnoustrojów w glebie pobranej z pola i łąki wahała się w ciągu okresu wegetacyjnego, wzrastając od wiosny ku jesieni. W powierzchniowej warstwie gleby było więcej drobnoustrojów niż w głębszej. Gleba z pola i z łąki, brana z tych samych poziomów, pod względem ilości drobnoustrojów nie wykazała wyraźnych różnic. Aktywność sacharazy w powierzchniowych warstwach gleby była wyższa, zwłaszcza na łące, a w głębszych niższa. Możliwe, że łączy się to z większą masą korzeni w warstwie na głębokości 5 - 10 cm i w związku z tym z liczną mikroflorą rizosfery. Ponieważ

TABELA I

Analiza różnych gleb — 1953 rok
Analyses of various soils — 1953

Oznaczenie Tests	Gleby Soil		
	ogrodowa garden soil	mada piaszczysta light alluvial soil	mada ciężka heavy alluvial soil
Ilość drobnoustrojów w milionach na 1 g gleby Viable count (10^6 per 1 g)			
bakterie — of bacteria	4,3	0,8	3,8
promieniowce — of streptomycetes	1,6	0,1	2,0
grzyby — of fungi	0,2	0,4	0,2
Aktywność sacharazy w mg rozłożonego cukru na 1 g gleby Saccharase activity mg of decomposed sugar per 1 g of soil	6,5	2,2	6,5
Ilość ryboflawiny w γ w 1 g gleby Amount of riboflavine, γ per 1 g of soil	0,028	0,020	0,022
Substancja organiczna w % węgla Carbon per cent	2,6	0,85	1,12

mikroflora również była liczniejsza w wierzchnich warstwach gleby, przeto można doszukiwać się pewnej zależności między ilością drobnoustrojów a aktywnością sacharazy, ścisłej korelacji nie dało się jednak stwierdzić.

Oznaczenie enzymów proteolitycznych, wykonane jednorazowo w glebie z pola i łąki, wykazało większą ich aktywność tylko w wierzchniej, darniowej warstwie gleby łąkowej. We wszystkich pozostałych próbkach gleby aktywność proteazy była jednakowa.

Aktywność ureazy okazała się wyższa w wierzchniej warstwie gleby, ale tylko w użytkowaniu łąkowym. Natomiast na polu ornym w poziomie 5 - 10 cm znaleziono mniej ureazy aniżeli w poziomie 15 - 20 cm.

Ryboflawiny było w tych glebach bardzo mało — w okresie wiosennym i w jesiennym w ogóle jej nie znaleziono, a w letnim niewiele. Na łące było jednak cokolwiek więcej niż w polu uprawnym (od 0,003 do 0,004 γ).

W 1955 r. przeprowadzono analizę gleby pobranej z doświadczenia uprawowego, założonego przez Zdzisława Goneta w Stacji Doświadczalnej w Swojcu. Poletka były rozmieszczone na glebie o typie lekkiej mady piaszczystej, o znacznej zmienności terenowej. Doświadczenie polegało na badaniu wpływu różnych przedplonów na plon główny i własności gleby. W 1955 r. na całym polu zasiano żyto. Jako obiekty do badań wybrano 8 poletek, na których w 1954 r. uprawiano różne rośliny przedplonowe. W zestawieniach cyfrowych przedstawiono porównawczo wyniki z 4 poletek: nr 14, na którym przedplonem była seradela, siana po późnej mieszance ozimej, nr 30 i 32 z przedplonem — łubin poplonowy po późnej

TABELA II

Analiza gleby w różnym użytkowaniu — 1954. Analyses of the soil grown with various cultures

Oznaczenie Tests	Pole uprawne — plough field						łąka — meadow					
	głębokość — depth											
	5 cm			20 cm			5 cm			20 cm		
	11.V	19.VI	18.X	11.V	19.VI	18.X	11.V	19.VI	18.X	11.V	19.VI	18.X
Drobnoustroje w milionach na 1 g gleby: Viable count 10^6 per 1 g of:												
bakterie — bacteria	2,0	4,9	5,3	1,8	1,2	5,5	2,4	3,6	6,6	1,5	1,6	5,4
promieniowce — streptomycetes	0,8	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	1,6	1,3	0,4	0,3	0,5	0,2
grzyby — fungi	0,2	0,1	0,02	0,03	0,1	0 1	0,06	0,1	0,1	0,02	0,05	0,0
Aktywność sacharazy Saccharase activity	12,3	10,2	10,4	8,9	7,8	6,2	31,1	23,5	17,2	7,1	8,5	7,7
Ryboflawina — Riboflavin	0,0	0,001	0,0	0,0	0,001	0,0	0,0	0,005	0,0	0,0	0,004	0,0
Substancja organiczna w % węgla Organic matter (carbon %)	0,76	0,78	0,74	0,72	0,73	0,73	1,30	1,47	1,12	0,77	0,86	0,83
Aktywność proteazy (szybkość upłynnienia żelatyny) Proteaze activity (the rate of gelatine liquefation)		18			18			33			18	
Aktywność ureazy w mg wytworzonego NH_3 na 1 g gleby Urease activity (mg of NH_3 produced per 1 g of soil)	0,42				1,19			1,23			0,65	

mieszance ozimej, nr 65 — poletko, na którym była mieszanka siewu wiosennego, silnie zachwaszczona. Dla porównania analogiczne oznaczenia przeprowadzono równolegle w próbkach gleby ogrodowej.

Uzyskane wyniki przedstawione są w tabelach III - VI.

TABELA III

Ogólna ilość drobnoustrojów tlenowych w 1 g suchej masy gleby w milionach 1955 rok

Viable count of aerobic microflora in millions per 1 g of soil (d. m.) 1955

Nr poletka Field N°	Bakterie Bacteria			Promieniowce Streptomycetes			Grzyby Fungi		
	10.V	4.VI	6.IX	10.V	4.VI	6.IX	10.V	4.VI	6.IX
14	7,2	4,3	5,1	0,7	1,8	0,3	0,1	0,03	0,2
30	5,8	4,6	7,6	0,2	2,0	0,6	0,07	0,06	0,1
32	7,6	4,6	4,7	1,0	1,7	0,4	0,06	0,05	0,1
65	3,1	1,1	3,9	0,1	1,2	0,04	0,06	0,06	0,2
gleba ogrod. garden - soil	3,2			0,7			0,1		

TABELA IV

Aktywność enzymatyczna gleby — 1955 rok

Enzymatic activity of soil — 1955

Nr poletka Field N°	Aktywność sacharazy w mg rozłożonego cukru na 1 g gleby Saccharase activity (mg of decomposed saccharose per 1 g of soil)			Aktywność proteazy (szybkość upłynnienia żelatyny) Protease activity (The rate of gelatine liquefation)			Aktywność ureazy w mg wytworzonego NH_3 na 1 g gleby Urease activity (mg of NH_3 produced per 1 g soil)		
	10.V	8.VI	6.IX	10.V	8.VI	6.IX	10.V	8.VI	6.IX
14	11,5	12,8	9,7	24,5	14,0	9,5	0,77	0,65	0,42
30	14,1	13,7	12,0	17,5	37,5	9,0	0,96	1,04	0,55
32	14,1	15,2	11,5	18,0	—	11,0	0,90	0,72	0,45
65	4,2	5,7	4,4	6,5	—	9,0	1,03	0,78	0,87
gleba ogrodowa garden - soil	14,1			42,5			13,0		

Stwierdza się zmienność sezonową ilości drobnoustrojów w glebie (Tab. III). W lecie ilość bakterii jest mniejsza niż na wiosnę i w jesieni, natomiast zwiększa się ilość promieniowców, chociaż nigdy nie dosięga ilości bakterii. Ilość bakterii w glebie po seradeli waha się od 4,3 do 7,2 milionów w 1 g gleby, zaś w glebie po łubinie od 4,6 do 7,6 milionów na 1 g gleby. Różnice nie wydają się istotne. Natomiast próbki pobrane

z poletka nr 65, na którym po mieszance jarej stan żyta był słaby, zawierają dwukrotnie niższą ilość bakterii. W próbce gleby ogrodowej stwierdzono niespodziewanie małą ilość bakterii, bo 3,2 miliona.

Aktywność sacharolityczna gleby po seradeli była nieznacznie niższa niż gleby po łubinie, natomiast aktywność sacharazy gleby z poletka nr 65 była niższa mniej więcej trzykrotnie. W glebie ogrodowej aktywność sacharazy była taka sama jak na poletkach z łubinem.

Oznaczenie aktywności proteolitycznej w okresie wiosennym wykazało znaczne różnice między poletkami; od 6,5 na poletku nr 65 do 24,5 na poletku nr 14. W glebie ogrodowej aktywność proteazy była prawie dwukrotnie wyższa niż na poletkach doświadczalnych. Przy jesiennych pomiarach aktywności proteazy w glebie, różnice pomiędzy poletkami były znacznie mniejsze, od 9,0 do 11,0.

Aktywność ureazy na poletkach doświadczalnych, w porównaniu z glebą ogrodową, była niska, dochodząc najwyżej do 1,04, podczas gdy w ogrodowej wynosiła 13,0. Różnice między poletkami były nieznaczne, nie przekraczające dziesiętnych części mg (Tab. IV).

TABELA V

Zawartość ryboflawiny i substancji organicznej w glebie — 1955 r.
The amount of riboflavine and organic matter in soil

Nr poletka Field N°	Zawartość ryboflawiny w γ w 1 g gleby The amount of riboflavine (γ per 1 g of soil)			Ilość substancji organicznej w % węgla The amount of organic matter (carbon per cent)		
	10.V	8.VI	6.IX	10.V	8.VI	6.IX
14	0,004	0,004	0,004	0,63	0,58	0,60
30	0,003	0,0	0,005	0,98	0,85	0,77
32	0,005	0,005	0,005	0,93	0,80	0,80
65	0,0	0,0	0,003	0,46	0,50	0,56
gleba ogrodowa garden - soil	0,005			3,31		

W tabeli V przedstawiono ilość znalezionej w próbkach gleby witaminy B_2. Okazało się, że są to ilości bardzo małe, bo zaledwie tysięczne części γ, wobec tego i różnice pomiędzy poletkami pod tym względem są trudne do oceny. W glebie z pola po łubinie i seradeli zawartość ryboflawiny wahała się w okresie wegetacyjnym od 0,0 (w jednym przypadku) do 0,005, zaś na poletku nr 65 na wiosnę i w lecie było 0,0, a w jesieni 0,003 γ ryboflawiny.

Zawartość substancji organicznej w glebie oznaczono jako procent węgla. Ilość substancji organicznej wynosiła (średnie z trzech oznaczeń wykonanych na wiosnę, w lecie i w jesieni): na poletku nr 14 po seradeli — 0,060, na poletku nr 30 po łubinie — 0,86, na poletku nr 32 również po łubinie — 0,84, na najsłabszym poletku nr 65 po mieszance jarej — 0,47, w glebie ogrodowej — 3,31.

Na badanych poletkach oznaczono również intensywność rozkładu błonnika w glebie, stosując polową metodę Kuźniara, która polega na zakopywaniu w polu odpowiednio spreparowanej bibuły. Ubytek wagi bibuły w określonym czasie wskazuje na intensywność rozkładu błonnika w glebie.

Próbę wykonano dwukrotnie: 1) na wiosnę, bibułę zakopano 10. V. a wykopano 25. VI. i 2) w jesieni, zakopano bibułę 6. IX., wyjęto 28. IX. Na każdym poletku umieszczono po trzy paski bibuły o wymiarach 5×35 cm i znanej wadze.

Z zestawienia VI wynika, że w okresie wiosennym (maj, czerwiec) błonnik był rozkładany wolniej niż w okresie jesiennym (wrzesień). Możliwe, że jedną z przyczyn tego była niska temperatura w miesiącu maju. Przy porównaniu stopnia rozkładu błonnika na różnych poletkach stwierdziliśmy większą intensywność tego procesu na poletkach z przedplonem seradeli i łubinu niż na poletku z przedplonem mieszanki jarej (nr 65).

TABELA VI

Intensywność rozkładu błonnika w glebie — rok 1955

The rate of cellulose decomposition in soil — 1955

Nr poletka Field N°	Ubytek wagi bibuły w % The decrease of weight of filter-paper (per cent)		
	10.V.-25.VI.	6.IX.-26.IX.	
14	51	72	
30	38	70	
32	57	81	
65	21	69	

Przy porównywaniu wskaźników użytych od charakterystyki gleby lekkiej z poletek doświadczalnych zaobserwowano pewną korelację. Poletko nr 65 wyróżnia się najuboższą mikroflorą, najsłabszą aktywnością sacharazy i proteazy, najmniejszą ilością ryboflawiny i substancji organicznej oraz najwolniej przebiegającym procesem rozkładu błonnika. Tylko aktywność ureazy była na tym poletku o kilka dziesiątych mg większa niż na pozostałych poletkach. Na poletkach nr 30, 32 i 14 wskaźniki są wyższe niż na poletku nr 65. Różnice pomiędzy poletkami 30, 32 i 14 są mało wyraźne.

Gleba ogrodowa w porównaniu do gleby lekkiej wykazywała znacznie wyższą aktywność enzymatyczną, zwłaszcza proteazy i ureazy, oraz 4 - 6-krotnie większą zawartość substancji organicznej. Natomiast liczebność bakterii tlenowych, wbrew oczekiwaniu, była w glebie ogrodowej niewielka, taka jak na najuboższym poletku nr 65.

Fakty te oraz wyniki prób wykonanych w latach poprzednich wskazują na konieczność nagromadzenia większej ilości materiału dowodowego, który pozwoli na dokładniejsze wyjaśnienie rodzaju i formy współzależności istniejącej niewątpliwie pomiędzy ilością mikroflory glebowej a wskaźnikami biochemicznymi.

WNIOSKI

Niniejsza praca nie dała wyraźnych odpowiedzi na postawione pytania, nasuwające się wnioski należy przeto traktować jako orientacyjne.

1. Oznaczanie sacharazy i ureazy jest szybkie i technicznie nie trudne, a prawdopodobieństwo uzyskania powtarzalnych wyników jest duże.

2. Metoda oznaczania proteazy jest łatwa, ale wiarygodność wyników jest mniejsza niż przy oznaczaniu innych enzymów: zbyt wiele szczegółów technicznych wpływa na wyniki.

3. Oznaczanie ryboflawiny i innych witamin może być przydatne w pracach z zakresu mikrobiologii gleby, ale w zastosowaniu do tzw. charakterystyki mikrobiologicznej gleby jest zbyt pracochłonne i długotrwałe.

4. Można przypuszczać, że pomiędzy ogólną ilością drobnoustrojów a aktywnością enzymatyczną gleby i zawartością w niej witamin istnieje związek przyczynowy, chociaż niewątpliwie związek ten jest komplikowany szeregiem czynników ubocznych.

Przypuszczenie to powinno być poparte dodatkowymi badaniami, które pozwolą na głębsze wyjaśnienie tych zjawisk.

Wydaje się też możliwe przystosowanie użytych wskaźników do charakterystyki biologicznej aktywności gleby.

LITERATURA

1. Drobnik J., 1955: *Folia Biologica.* **1** : 29.
2. Drobnik J. i Seifert J., 1955: *Folia Biologica,* **1** : 41.
3. Hofmann E., 1952: *Zeitschr. Pflanzenernh. Düng. Bdk.,* **56** : 68.
4. Hofmann E., u. Niggermann J., 1953: *Biochem. Zeitschr.,* **324** : 308.
5. Hofmann E. u. Schmidt W., 1953: *Biochem. Zeitschr.,* **324** : 125.
6. Krasilnikow N. A., 1952: *Usp. Sowr. Bioł.,* **33** : 321.
7. Methods of Vitamins Assay, by the Association of Vitamin Chemists 1947.
8. Scheffer u. Twachtmann R., 1953: *Zeitschr. Pflanz. Düng. Bdk.* **62** : 158.
9. Schmidt E. L. a. Starkey R. S., 1951: *Soil Sci.,* **71** : 221.
10. Seegerer A., 1953: *Zeitschr. Pflanz. Düng. Bdk.,* **61** : 251.

N. Balicka and *M. Trzebiński*

THE ENZYMIC ACTIVITY AND THE AMOUNT OF VITAMIN B_2 IN SOIL

Summary

The activities of saccharase, urease and protease and the amount of vitamin B_2 in various soils and in the same soil grown with various crops were measured during three years period. The viable count of microorganisms was made at the time of examinations of enzymic activity of soil.

It was the authors' aim to find whether there is any correlation between the enzymic activity and the number of microorganisms in soil.

The results of investigation are depicted in tables I - VI. Some correlation was found between the viable count of microorganisms and enzymic activity of soil.

The interpretation of obtained results is at present time hardly feasible, due to many factors not yet known influencing the enzymic activity of soil.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 385 - 400

A. Szember

WPŁYW DODATKU TZW. „CHWASTU RYBNEGO" NA ROZWÓJ MIKROFLORY W KISZONKACH ZIEMNIACZANYCH *

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło 15 marca 1956 r.

Stały rozwój hodowli zwierząt gospodarskich w Polsce wymaga znacznego rozszerzenia bazy paszowej. Dlatego też jest rzeczą konieczną opracowanie racjonalnych metod konserwowania pasz oraz stosowanie jako surowców kiszonkowych nowych produktów ubocznych, często odpadkowych.

Najlepszym sposobem konserwowania pasz jest ich zakwaszanie na drodze biologicznej. Niestety, nie zawsze się to udaje z paszami bogatymi w białko. Możemy jednak otrzymać kiszonki bogate w białko, sporządzając je z surowców węglowodanowych, zmieszanych z dodatkiem „białkowych" roślin motylkowych. Uzyskane w ten sposób mieszanki paszowe kiszą się wyśmienicie, dając produkt wysokiej jakości (Herzig 1946, Bieriezowski 1951, Łysogorow, Sołtykow i Werbicz 1951, Szember 1952).

Można też od razu zakwaszać pasze białkowe kwasami mineralnymi w myśl metody „A.I.V." (Virtanen, 1947). Przy pomocy tej metody można sporządzać kiszonki z samych produktów pochodzenia zwierzęcego, np. z wątroby rybiej. Kiszonki takie są chętnie zjadane przez kury (Olsson, 1942)

W celu uzyskania kiszonek z ziemniaków silnie wzbogaconych w białko, zaczęto dodawać do parowanych ziemniaków tzw. „chwast rybny" (Kirsch, Jantzon i Sieden, 1943). Próby te zostały podjęte również w Polsce w Zakładzie Żywienia Zwierząt UMCS w Lublinie (Kolowca, 1953) i równolegle przez autora niniejszej pracy. W próbach naszych zastosowano znacznie większe dawki ryby niż w próbach badaczy niemieckich.

Dodatek ryb słodkowodnych w stanie surowym wzbogaca parowane ziemniaki nie tylko w białko, ale i w witaminy. Znaleziono między innymi, że w rybach tych znajduje się witamina A_2 (Morton i Creed, 1939), a cennej witaminy B_6 jest w rybach znacznie więcej niż w owocach i warzywach (Schneider, Ascham, Platz, Steenbock, 1940). Według Diewiatnina (1948) ilość witaminy B_6 w mięsie ryb morskich, np. dorsza sięga 10 γ na 1.0 g świeżej masy, podczas gdy w ziemniakach znajdują się tylko ślady.

Szersze omówienie badań mikrobiologicznych nad kiszonkami paszowymi można znaleźć w referacie przeglądowym autora (Szember, 1954).

Obecnie podjęto badania chemiczne i żywieniowe nad powyższymi kiszonkami w Instytucie Zootechnicznym w Puławach, gdzie Skulmowski i Drzas otrzymali już zachęcające wstępne wyniki. Mianowicie sporządzone przez nich kiszonki ziemniaczane z dodatkiem surowej ryby były chętnie zjadane przez kury. Kiszonki te odznaczały się również dużą trwałością.

* Praca niniejsza, jak również poprzednie prace autora tegó samego cyklu, została wykonana dzięki dotacjom otrzymanym w latach 1950 - 1953 z Komisji Popierania Twórczości Naukowej i Artystycznej przy Prezydium Rady Ministrów.

Autor niniejszej pracy poświęcił szczególną uwagę procesom mikrobiologicznym zachodzącym podczas zakiszania parowanych ziemniaków wzbogacanych w białko różnymi dawkami ryby.

BADANIA WŁASNE

Ogółem przeprowadzono w ciągu lat 1952 - 1955 cztery doświadczenia kiszonkowe. We wszystkich tych doświadczeniach zakiszano parowane ziemniaki, najczęściej odmiany „Dar", dodając do nich różne ilości drobno posiekanego tzw. „chwastu rybnego" (płocie, leszcze). Najpierw ziemniaki parowano w temperaturze 100° przez około 1,5 godziny. Po dokładnym wymieszaniu gorących ziemniaków z rybą i po ich ostudzeniu, wkładano je do zbiorników i mocno ubijano.

Jako zbiorników kiszonkowych używano 3-litrowych wysokich słojów szklanych i 40-litrowych naczyń kamionkowych. Zbiorniki zaopatrzone były w górnej części w specjalny kołnierz napełniany solanką, do którego wchodziła przykrywa. Chroniło to zbiorniki przed dostępem powietrza i zakażeniem.

Doświadczenie I przeprowadzono na wiosnę 1952 roku w trzech równoległych powtórzeniach. W każdej kombinacji stosowano dwie równoległe kamionki o pojemności 40 l oraz jeden słój 3-litrowy, w celu stwierdzenia różnic w przebiegu fermentacji mlekowej w małych i stosunkowo dużych zbiornikach.

Doświadczenie I składało się z następujących kombinacji:

1. Ziemniaki parowane + 7,5% ryby surowej.
2. Ziemniaki parowane + 7,5% ryby surowej + 1% świeżej koniczyny.
3. Ziemniaki parowane + 7,5% ryby parzonej + 1% świeżej koniczyny
4. Ziemniaki parowane + 7,5% ryby parzonej.

Ryby parzono przez jednorazowe oblanie ich wrzącą wodą. Drobno posiekaną rybę dokładnie mieszano z rozgniecionymi i jeszcze gorącymi ziemniakami (w temperaturze około 90°), a następnie po ostudzeniu mieszaniny ładowano ją do zbiorników. W kombinacjach 2 i 3 dodano po 1% posiekanych łodyg i liści koniczyny, traktując ją jako ewentualną szczepionkę drobnoustrojów.

Oznaczenia ilości mikroflory przeprowadzano codziennie przez 10 dni, a następnie po 14, 23 i 120 dniach fermentacji odbywającej się w temperaturze około 16 - 18°.

Doświadczenie II przeprowadzono w jesieni 1952 r. w dwóch równoległych powtórzeniach. Jako zbiorniki na kiszonkę służyły tu kamionki o pojemności 40 l.

Doświadczenie II składało się z następujących kombinacji:

1. Ziemniaki parowane + 10% surowej ryby
2. Ziemniaki parowane + 15% surowej ryby
3. Ziemniaki parowane + 20% surowej ryby
4. Ziemniaki parowane + 25% surowej ryby.

Celem tego doświadczenia było ustalenie górnej dopuszczalnej granicy dodatku ryby, przy której kiszonka jeszcze nie ulega zepsuciu. Doświadczenie trwało 140 dni w temperaturze otoczenia (około 16 - 18°). Na początku zakiszania temperatura otoczenia wynosiła jednak tylko 0°, a w ciągu kilku dni spadła nawet do —6°.

Analizy mikrobiologiczne wykonywano przez pierwsze 7 dni codziennie, a następnie po 10, 80 i po 140 dniach trwania doświadczenia.

Doświadczenie III założono w jesieni 1953 r. W doświadczeniu tym sporządzono tylko jedną kombinację, a mianowicie: parowane ziemniaki z dodatkiem dużej ilości — 20% — surowej ryby. Prowadzono je w dwóch równoległych powtórzeniach w szklanych zbiornikach o pojemności 3 l. W doświadczeniu trzecim nie oznaczano ilości mikroflory. Badano natomiast bliżej rodzaj mikroflory rozwijającej się w kiszonkach. W tym celu z robionych co 2 - 3 dni wysiewów wyodrębniano różne szczepy bakterii kwaszących. Szczepy te następnie poddawano oczyszczeniu, przesiewając je wielokrotnie na płytkach Petriego z pożywką dla bakterii mlekowych. Uzyskane w ten sposób czyste hodowle określano.

Doświadczenie IV założono w zimie 1955 r. Były tu następujące kombinacje:

1. Ziemniaki parowane + 20% surowej ryby
2. Ziemniaki parowane + 30% surowej ryby
3. Ziemniaki parowane + 8% surowej ryby

Celem tego doświadczenia było ponowne sprawdzenie, czy można otrzymać dobrą kiszonkę ziemniaczaną po dodaniu do parowanych ziemniaków bardzo dużych ilości ryby. Prócz tego w doświadczeniu tym dodano surową rybę, którą trzymano uprzednio przez 7 dni w temperaturze około 20° w wyniku czego uległa ona częściowo zgniciu (kombinacja 3). Czas trwania całego doświadczenia wynosił 60 dni. Wysiewy mikroflory przeprowadzano codziennie przez 10 dni, a następnie po 14, 21 i po 60 dniach fermentacji. Izolowane szczepy bakterii kwaszących oczyszczano, podobnie jak w doświadczeniu poprzednim, a czyste kultury tych szczepów poddano następnie diagnozie. Oznaczano też ich siłę kwaszenia, hodując je na pożywce płynnej o następującym składzie: laktoza — 20 g, glikoza — 20 g, pepton — 5 g, woda drożdżowa — 200 ml i 1000 ml wody wodociągowej. Badano również zdolność wytwarzania przez badane szczepy acetoiny. Stosowano przy tym odczyn Voges-Proskauera, hodując szczepy na podłożu Clarka.

Badania mikrobiologiczne kiszonek we wszystkich przeprowadzanych doświadczeniach objęły następujące grupy mikroorganizmów: a) bakterie: kwaszące, proteolityczne, z grupy *coli-aerogenes*, fermentacji masłowej, b) drożdże.

Badania ilości mikroorganizmów przeprowadzano metodą płytkową, a bakterii fermentacji masłowej metodą rozcieńczeń.

W próbach tych stosowano podobne rozcieńczenia i te same pożywki selektywne dla każdej z badanych grup drobnoustrojów, co w poprzedniej pracy autora (Szember, 1952).

W doświadczeniu I i IV przy oznaczaniu ilości bakterii obliczono błąd standardowy średniej arytmetycznej oraz test istotności χ^2.

Ponadto porównano między sobą poszczególne kombinacje pod względem ilości bakterii kwaszących. W szczególności porównano ilości wyrosłych na płytkach kolonii przy rozcieńczeniu 1 : 10 milionów, używając testu *t* Studenta.

Oznaczenia *pH* przeprowadzano potencjometrycznie, w pierwszych trzech doświadczeniach przy użyciu elektrody chinhydrynowej, a w doświadczeniu czwartym elektrody szklanej.

Ogólną ilość kwasu mlekowego oraz octowego i masłowego oznaczano przy pomocy metody Leppera (1938). Ocenę kiszonek przeprowadzano przy pomocy klucza Fliega (1938) i na podstawie ilości w nich N-amoniakalnego.

Analizy chemiczne i próby żywieniowe kiszonek otrzymanych z dwóch pierwszych doświadczeń przeprowadził Kolowca (1953) w Zakładzie Żywienia Zwierząt UMCS w Lublinie, a w pozostałych doświadczeniach autor niniejszej pracy.

Doświadczenie I. Wyniki doświadczenia I zebrano w tabeli I. W tabeli I widać wyraźną różnicę w ilości mikroflory kwaszącej w po-

TABE

Wpływ dodatku 7,5% ryby do parowanych ziemniaków na rozwój różnych grup masy

The effect of the admixture of 7,5% of fish-meat to steamed potatoes on the in thousands

Rodzaj drobnoustrojów Microorganisms	Kombinacje Experiment	Ilość dni				
		1	2	3	4	5
bakterie kwaszące	1	1.430.000	2.850.000	8.950.000	2.380.000	1.190.000
acidifying bacteria	2	2.180.000	7.130.000	13.210.000	4.670.000	1.210.000
	3	2.050.000	4.540.000	11.250.000	3.340.000	870.000
	4	1.010.000	6.040.000	11.900.000	5.120.000	1.960.000
Bakterie proteolityczne	1	1.430	10	23	<1	<0,1
proteolytic bacteria	2	790	<10	<10	„	„
	3	3.810	<10	„	„	„
	4	2.200	36	„	„	„
Bakterie z grupy	1	3,8	0,9	0,3	<0,1	0,5
coli-aerogenes	2	7,4	14,6	15,3	4,3	2,2
coli aerogenes group	3	11,5	23,3	93,0	<10	2,6
	4	10,8	38,0	206,0	73,0	0,6
Bakterie fermentacji	1		<1	<1	<0,1	<0,1
masłowej	2	—	1,5	1,2	<1	„
butyric acid bacteria	3		60,0	61,0	<10	„
	4		55,0	56,0	70,0	„
Drożdże	1					
yeasts	2	—	—	—	—	—
	3					
	4					

Komb. 1 parowane ziemniaki + 7,5% surowej ryby
2 „ „ + 7,5% „ „ + 1% świeżej koniczyny
3 „ „ + 7,5% parzonej ryby + 1% „ „
4 „ „ + 7,5% „ „

szczególnych kombinacjach. Kombinacje 2 i 3, w których dodano oprócz ryby po 1% świeżej koniczyny, pomimo różnic w traktowaniu ryby w tych kombinacjach (w kombinacji 3 rybę parzono), mają po pierwszym dniu fermentacji prawie jednakowe ilości mikroorganizmów kwaszących. W kombinacji 4, w której dodano tylko sparzoną rybę, obserwujemy w tym samym czasie najmniejszą ilość bakterii kwaszących. Stosunkowo najsłabiej rozwijała się mikroflora kwasząca w kombinacji 1.

Największą ilość bakterii kwaszących znajdujemy we wszystkich kombinacjach tego doświadczenia po 3 dniach fermentacji. Po 23 dniach ilość bakterii kwaszących wyrównuje się mniej więcej we wszystkich kombi-

LA I

drobnoustrojów w kiszonce. — Ilość mikroorganizmów w tysiącach na 1,0 g świeżej kiszonki

development of microorganisms in the silage. — Number of microorganisms — per 1 g

fermentacji — days of fermentation

6	7	8	9	10	14	23	120
8.350.000	1.160.000	990.000	660.000	110.000	50.000	450.000	50.000
930.000	990.000	1.810.000	320.000	100.000	60.000	610.000	200.000
1.730.000	1.620.000	1.360.000	170.000	140.000	393.000	660.000	40.000
4.340.000	2.560.000	2.900.000	820.000	480.000	80.000	740.000	30.000
					<0,1	<0,1	<1
—	—	—	—	—	,,	,,	,,
					,,	,,	,,
					,,	,,	,,
<0,1	<0,1	<0,1			<0,1	<0,1	<0,1
1,4	,,	,,	—	—	,,	,,	,,
0,8	,,	,,			,,	,,	,,
1,4	,,	,,			,,	,,	,,
					86	33	5.680
					280	496	6.020
—	—	—	—	—	153	126	5,740
					252	56	5.810

Series 1 steamed potatoes + 7,5% of raw fish
2 ,, ,, + 7,5% ,, ,, ,, + 1% of clover
3 ,, ,, + 7,5% of steamed fish + 1% of clover
4 ,, ,, + 7,5% ,, ,, ,,

nacjach, a po 120 dniach wynosi około 30 - 50 milionów w 1,0 g świeżej masy kiszonki, z wyjątkiem kombinacji 2, gdzie ilość ich jest kilkakrotnie większa.

Na podstawie tych wyników i ich analizy statystycznej możnaby sądzić, że rozrzut ilości kolonii bakterii kwaszących na płytkach mieści się w granicach błędu doświadczalnego.

Dla porównania średnich ilości kolonii bakterii kwaszących w poszczególnych kombinacjach kiszonkowych użyto testu *t* Studenta. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli II.

TABELA II

Doświadczenie I. Wartość *t* (test istotności Studenta) uzyskane z porównania między sobą poszczególnych kombinacji kiszonkowych

Experiment I. Values of *t*; between various series

Porównano kombinacje	Wartości dla *t* w poszczególnych dniach fermentacji												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	14	23	120
1 z 2	57,30	365,52	277,88	240,52	2,05	518,76	16,50	71,92	33,17	1,68	0,39	16,31	21,45
1 z 3	29,44	127,90	158,50	78,54	28,26	447,18	42,92	31,00	51,05	3,42	45,72	28,14	0,46
1 z 4	35,14	109,24	203,33	287,89	70,00	288,00	112,90	179,28	17,36	44,38	4,37	35,80	1,94
2 z 3	6,46	174,89	203,47	101,27	30,92	57,97	75,00	38,07	17,62	4,98	36,41	5,98	19,04
3 z 4	54,73	49,07	77,38	135,62	85,54	195,14	89,15	140,00	80,24	41,97	44,52	11,04	1,15

Kombinacja 1 parowane ziemniaki + 7,5% surowej ryby
2 „ „ + 7,5% „ „ + 1% świeżej koniczyny
3 „ „ + 7,5% parzonej ryby + 1% „ „
4 „ „ + 7,5% „ „

Series 1 — steamed potatoes + 7,5% of raw fish
2 — „ „ + 7,5% „ „ „ + 1% of clover
3 — „ „ + 7,5% of steamed fish + 1% of clover
4 — „ „ + 7,5% „ „ „

Jak widzimy, w ciągu prawie całego czasu trwania doświadczenia, wartości uzyskane dla *t* leżą powyżej 2,228 (dla 6 powtórzeń przy 10 stopniach swobody i przy 5% poziomie istotności). Można by z tego wnioskować, że różnice między ilością mikroflory kwaszącej w poszczególnych kombinacjach kiszonkowych tego doświadczenia są istotne.

W poszczególnych kombinacjach znajdujemy różne ilości bakterii proteolitycznych, bakterii z grupy *coli-aerogenes* i bakterii fermentacji masłowej. Największe ilości niekorzystnej mikroflory obserwujemy w kombinacjach, w których użyto ryby sparzonej (kombinacje 3 i 4). Wbrew więc oczekiwaniu częściowa sterylizacja ryby wzmogła rozwój tych niekorzystnych grup bakterii.

Szybki rozwój mikroflory kwaszącej powodował jednak znikanie ze wszystkich kombinacji niekorzystnej mikroflory. Najwcześniej, po 3 dniach fermentacji, znikały bakterie proteolityczne, następnie bakterie fermen-

TABELA III

Doświadczenie II. Wpływ ilości ryby na rozwój różnych grup drobnoustrojów w kiszonce ziemniaczano-rybnej. Ilość mikroorganizmów w tysiącach na 1,0 g świeżej masy kiszonki

The effect of the amount of added fish-meat on the number of microorganisms in potato silage. (Microorganisms in thousands per 1 g of the silage)

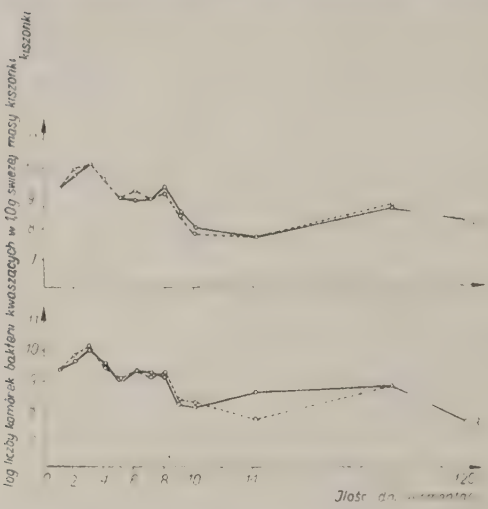
Drobnoustroje Microorganisms	Kombinacje Exper.	Ilość dni fermentacji — Days of fermentation									
		1	2	3	4	5	6	7	10	80	140
Bakterie kwaszące Acidifying bacteria	1	596.000	719.000	410.000	563.000	317.000	424.000	190.000	531.000	136.000	102.000
	2	510.000	810.000	280.000	690.000	104.000	447.000	540.000	547.000	153.000	101.000
	3	493.000	892.000	90.000	270.000	62.000	477.000	170.000	495.000	138.000	104.000
	4	393.000	330.000	260.000	220.000	133.000	195.000	370.000	255.000	153.000	99.000
Bakterie proteolit. Proteolytic bacteria	1	40	<10	<10	3,0	1,0	1,4	<0,1	<0,1	<0,1	<0,01
	2	420	<10	<10	3,0	2,0	2,0	3,1	0,3	<0,1	<0,01
	3	520	<10	<10	4,0	9,0	7,0	3,9	0,7	<0,1	0,04
	4	610	<10	<10	6,0	10,0	43,0	2,6	1,4	<0,1	1,6
Bakterie z grupy *coli-aerogenes* *Coli-aerogenes* group	1	0,33	2,1	1,3	0,1	<0,1	<0,1			<0,1	
	2	0,66	3,7	2,7	0,3	0,7	<0,1			<0,1	
	3	1,1	5,0	1,5	0,3	1,0	<0,1	—	—	<0,1	
	4	2,0	9,5	3,1	0,5	0,7	<0,1	—		<0,1	
Bakterie fermentacji masłowej Butyric acid bacteria	1	—	0,6	0,4	—		0,2	<0,1			
	2	—	0,5	0,4	—	—	0,4	<0,1	—	—	—
	3	—	0,1	0,3			<0,1	<0,1			
	4	—	0,4	0,4	—	—	0,3	<0,1	—	—	—
Drożdże Yeasts	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.000
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48.000
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	52.000
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50.000

Objaśnienia: Komb. 1 parowane ziemniaki + 10% surowej ryby
2 „ „ + 15% „ „
3 „ „ + 20% „ „
4 „ „ + 25% „ „
(—) nie badano

Series 1 addition of 10% raw fish meat
2 „ „ 15% „ „ „
3 „ „ 20% „ „ „
4 „ „ 25% „ „ „
(—) not examined

tacji masłowej — po 5 dniach i najpóźniej bakterie z grupy *coli-aerogenes*, których nie znajdywano w kiszonkach dopiero po 7 dniach kiszenia.

Drożdże zaczęto badać w tym doświadczeniu po 14 dniach fermentacji kiszonki. Ilość tych drobnoustrojów wzrastała w kiszonkach wraz z postępem fermentacji i po 120 dniach przechowywania kiszonek znaleziono w nich, niezależnie od ich rodzaju, po kilka milionów komórek na 1,0 g świeżej masy kiszonek.



Rys. 1. Rozwój bakterii kwaszących w kiszonkach ziemniaczano-rybnych (parowane ziemniaki +7,5% surowej ryby +1% świeżej koniczyny).
Rys. 2. Rozwój bakterii kwaszących w kiszonkach ziemniaczano-rybnych (parowane ziemniaki +7,5% parzonej ryby +1% świeżej koniczyny).

Fig. 1. Number of acidifying bacteria in the silage (steamed potatoes +7,5% of raw fish +1% of clover)

Fig. 2. Number of acidifying bacteria in the silage (steamed potatoes +7,5% steamed fish +1% of clover)

—o—o—o— w zbiornikach 40 litrowych; in 40 l containers

- - o - - o - - w zbiornikach 3 litrowych; in 3 l containers

Zmiany wartości *pH* w poszczególnych kombinacjach podczas trwania fermentacji kiszonek pierwszego doświadczenia były mniej więcej jednakowe. Już po 4 dniach *pH* we wszystkich kombinacjach wahało się w granicach 4,2 - 4,3.

Analizy chemiczne kiszonek wykazały w nich po upływie 120 dni około 3,5% kwasu mlekowego, około 0,5% kwasu octowego i około 0,02% kwasu masłowego, bez większych różnic w poszczególnych kombinacjach. Kiszonki te miały w tym czasie *pH* 3,8% (K o l o w c a, 1953).

W doświadczeniu I wszystkie kombinacje kiszonkowe badano w trzech równoległych powtórzeniach. Dwa powtórzenia nastawiono w kamionkach o pojemności 40 l, a trzecie w szklanych słojach o pojemności 3 l.

Na wykresie I porównano krzywe obrazujące rozwój bakterii kwaszących w kiszonkach fermentujących w zbiornikach o pojemności 40 l, z krzywymi rozwoju tych mikroorganizmów w kiszonkach w zbiornikach 3 l. Porównano tylko kombinacje 2 i 3, tj. z rybą świeżą i sparzoną.

Jak wynika z wykresu 1, wielkość zbiornika, w którym przeprowadzano zakiszanie pasz, nie miała w warunkach doświadczalnych wpływu na nasilenie rozwoju mikroflory kwaszącej w kiszonkach.

D o ś w i a d c z e n i e II. W jesieni 1952 r. założono nowe doświadczenie kiszonkowe, którego celem było ustalenie najwyższej dopuszczalnej dawki drobnicy rybnej. W doświadczeniu tym, wobec stwierdzenia, że parzenie ryby nie wpływa dodatnio na rozwój mikroflory w kiszonce,

dodawano rybę wyłącznie w stanie surowym. Wyniki tego doświadczenia zestawiono w tabeli III.

Z tabeli III wynika, że rozwój bakterii kwaszących w tym doświadczeniu był znacznie słabszy niż w doświadczeniu poprzednim (tabela I). Najwięcej drobnoustrojów znaleziono przy dodatku 10 - 20% ryby (kombinacje 1, 2 i 3) po dwóch dniach kiszenia. Ilość ich wynosiła tu około 700 - 900 milionów komórek na 1,0 g świeżej masy kiszonek, podczas gdy w tym samym wieku kiszonki doświadczenia I zawierały po kilka miliardów bakterii kwaszących na 1 g. Najsłabszy rozwój bakterii kwaszących obserwujemy przy dodatku 25% ryby (kombinacja 4), gdzie już po drugim dniu ilość ich zamiast wzrastać obniżała się i była mniejsza niż przy dodatku 10 - 20% ryby. W kiszonkach 10-dniowych i starszych ilości bakterii kwaszących były w pierwszych trzech kombinacjach mniej więcej takie same, a w kombinacji 4 mniejsze.

W przeciwieństwie do ilości bakterii kwaszących ilość bakterii proteolitycznych wzrastała w poszczególnych kombinacjach wraz ze zwiększaniem się dawki ryby. Największą ilość znaleziono we wszystkich kombinacjach po pierwszym dniu fermentacji, po dwóch dniach ilość ich jednak wszędzie malała. Rozwój tych bakterii został zahamowany najwcześniej w kombinacji 1, podczas gdy w kombinacjach pozostałych znajdowano je jeszcze po 10 dniach kiszenia, a przy 25% ryby nawet po kilku miesiącach, jakkolwiek w ilościach drobnych.

Podobnie zachowywały się bakterie z grupy *coli-aerogenes*, których ilość również powiększała się w poszczególnych kombinacjach wraz ze zwiększaniem się zawartości ryby. Maksimum ich rozwoju obserwowano we wszystkich kombinacjach po dwóch dniach fermentacji. Bakterie należące do tej grupy znikały prawie całkowicie w kombinacji 1 już po czterech dniach, a przy większych dawkach ryby po sześciu dniach fermentacji (tabela III).

Bakterii fermentacji masłowej znaleziono w tym doświadczeniu mało, gdyż największa ich ilość dochodziła do około 600 komórek na 1,0 g świeżej masy kiszonki. Już po siedmiu dniach fermentacji ilość ich spadła.

W doświadczeniu II znaleziono po 140 dniach kiszenia duże ilości drożdży, bo dochodzące do około 50 milionów komórek na 1,0 g świeżej

TABELA IV

Doświadczenie III. Skład chemiczny kiszonek po 5-miesięcznym przechowywaniu. Kombinacje: ziemniaki parowane + 20% surowej ryby (w procentach świeżej masy)
Experiment III. Chemical analyses of the silage after 5 months of storage. Series: steamed potatoes + 20% raw fish

Ilość kwasów organicznych w procentach Amount of organic acids per cent				pH	N ogólny % N - total %	N amoniakalny % N - NH_4 %
Kwas mlekowy Lactic acid		kwas octowy acetic acid	kwas masłowy butyric acid			
ogólny total	wolny free					
3.12	0,67	0,48	0,04	4,4	0,83	0,04

masy kiszonki. Stanowi to około 50% w stosunku do obecnych w tym czasie w kiszonce bakterii kwaszących (tabela III). Ilości drożdży zapewne nie zależały tu od wysokości dawki ryby.

Spadek odczynu kiszonek był tym powolniejszy, im większych ilości ryby użyto w doświadczeniu. W kombinacji 1 i 2 odczyn spadł zaledwie do *pH* 5,2 dopiero po 10 dniach fermentacji. W kombinacji 3 w tym czasie *pH* miało wartość 5,4, a w kombinacji 4 nawet 5,8.

Tylko w kombinacji 1 stwierdzono po 80 dniach przechowywania odpowiednie *pH* kiszonki (4, 2). W pozostałych kombinacjach odczyn był nieco za wysoki (4,5 - 4,8).

Oznaczenia ilości kwasów w tych kiszonkach wykazały jednak dość poprawne ich ilości. Kiszonki te zawierały po 80 dniach przechowywania około 2,0% kwasu mlekowego (ogólnego), około 0,5% kwasu octowego i małe ilości kwasu masłowego (0,04%). Również próby żywieniowe wypadły pomyślnie. Kiszonki te według K o l o w c y (1953) były chętnie zjadane przez świnie.

Powolny przebieg fermentacji mlekowej w drugim doświadczeniu wynikał zapewne przede wszystkim z niskiej temperatury otoczenia.

TABE

Doświadczenie IV. Wpływ dodatku surowej ryby do parowanych
Ilość drobnoustrojów w tysiącach
Experiment IV. The effect of admixture of raw fish to steamed
Microorganisms in thou

Rodzaj drobnoustrojów Microorganisms	Kombinacje Exper.	Ilość dni fermentacji w temp. 16° - 18°				
		1	2	3	4	5
Bakterie kwaszące Acidifying bacteria	1	1.518.000	3.780.000	1.540.000	2.950.000	2.020.000
	2	2.540.000	3.900.000	1.590.000	2.350.000	1.840.000
	3	3.030.000	11.900.000	3.400.000	2.200.000	2.270.000
Bakterie proteolityczne Proteolytic bacteria	1	67,0	2,3	<0,02	0,3	<0,02
	2	158,0	4,5	5,1	1,0	<0,02
	3	311,0	440,0	260,0	259,0	103,0
Bakterie z grupy *coli-aerogenes* *Coli areogenes* group	1	1,0	1,5	0,3	<0,02	—
	2	1,4	1,1	0,8	<0,02	—
	3	17,0	41,0	32,0	12,0	7,0
Bakterie fermentacji masłowej Butyric acid bacteria	1	3,8	0,5	<0,02	<0,02	—
	2	4,5	0,6	0,06	<0,02	—
	3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	—
Drożdże Yeasts	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—

Objaśnienia: Komb. 1 parowane ziemniaki + 20% surowej ryby
2 „ „ + 30% „ „
3 „ „ + 8% „ - nadgniłej ryby
(—) nie badano

Temperatura ta wynosiła w pierwszym okresie zakiszania około 0°, a w ciągu kilku dni spadła nawet do około —6°.

Doświadczenie III przeprowadzono w jesieni 1953 r. Nastawiono tu jeszcze raz kiszonkę ziemniaczaną z dodatkiem dużej ilości ryby. Temperaturę kiszenia utrzymywano w granicach 16 - 18°. Kombinacją doświadczalną były ziemniaki z 20% surowej ryby. Kiszonkę nastawiono w dwóch równoległych powtórzeniach. Doświadczenie trwało 5 miesięcy. Nie oznaczano w nim ilości drobnoustrojów kwaszących, badano natomiast jakościowy skład mikroflory (tabela VIII). Po 3 - 4 dniach stwierdzono już tylko nieliczne szkodliwe drobnoustroje (bakterie proteolityczne, pałeczki z grupy *coli-aerogenes*), poniżej 10 komórek na 1,0 g świeżej masy kiszonki.

Gotowa kiszonka miała przyjemny aromat. Po 5-miesięcznym przechowywaniu w 0,1 g świeżej masy kiszonki znajdowało się jeszcze około 125 milionów bakterii kwaszących, brak natomiast było bakterii proteolitycznych i bakterii z grupy *coli-aerogenes*.

Wyniki analiz chemicznych kiszonek tego doświadczenia zebrano w tabeli IV.

LA V

ziemniaków na rozwój różnych grup drobnoustrojów w kiszonce.
na 1 g świeżej masy kiszonki
potatoes on the development of microorganisms in the silage
sands per 1 g of the silage

Days of fermentation

6	7	8	9	10	14	21	60
2.410.000	1.850.000	430.000	2.250.000	1.450.000	1.200.000	650.000	170.000
2.510.000	1.760.000	460.000	2.550.000	730.000	1.440.000	890.000	150.000
1.760.000	1.670.000	3.020.000	3.870.000	2.220.000	1.320.000	—	84.000
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	23,0	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
<0,1	<0,1	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
<0,1	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1
—	—	440	550	2.880	7.000	59.000	37.000
—	—	470	565	2.930	6.000	70.000	30.000
—	—	—	—	—	—	—	16.000

Series 1 steamed potatoes + 20% of raw fish
2 „ „ + 30% „ „ „
3 „ „ + 8% „ „ „
(—) not investigated.

Przy pomocy klucza Fliega oceniano tę kiszonkę na 36 punktów. Można ją więc uważać za bardzo dobrą.

Wyniki doświadczenia III potwierdzają przypuszczenie, że z parowanych ziemniaków można otrzymać bogatą w białko kiszonkę, dodając do nich 20% surowej ryby.

Doświadczenie IV założono w styczniu 1955 r. Miało ono na celu ustalenie górnej dopuszczalnej granicy dodatku ryby do ziemniaków. Czas trwania tego doświadczenia wynosił 60 dni, temperatura 16 - 18°.

Wyniki doświadczenia IV zestawiono w tabeli V.

W doświadczeniu tym największe ilości bakterii kwaszących znaleziono po dwóch dniach zakiszania, przy czym ilość ich była mniej więcej jednakowa przy dawkach 20 i 30 % ryby. Specjalnie dużo bakterii kwaszących (około 11 miliardów na 1,0 g) zanotowano w kiszonce z rybą zepsutą.

TABELA VI

Doświadczenie IV. Skład chemiczny kiszonek po 60 dniach ich fermentacji (w %% świeżej masy)

Experiment IV. Analyses of the silage after 60 days of storage

Kombinacje Series	Ilość kwasów organicznych w % Amount of organic acids %			N - ogólny % N - total %	N - amoniakalny % $N-NH_4$ %	Sucha masa % Dry matter %
	kwas mlekowy (ogólny) lactic acid (total)	kwas octowy acetic acid	kwas masłowy butyric acid			
1	2,33	0,35	0,020	0,91	0,069	22,5
2	1,90	0,25	0,020	1,27	0,078	20,0
3	1,78	0,20	0,005	0,72	0,084	27,0

Objaśnienie: Kombinacja 1 parowane ziemniaki + 20% surowej ryby
2 „ „ + 30% „ „
3 „ „ + 8% „ nadgniłej ryby

Series 1 steamed potatoes + 20% of raw fish
2 „ „ + 30% „ „ „
3 „ „ + 8% „ „ „

Rozwój bakterii proteolitycznych w kombinacji 1 (20% ryby) był silnie stłumiony już po trzech dniach, a w drugiej (30% ryby) po pięciu dniach. W kombinacji ze zgniłą rybą znajdowano duże ilości bakterii proteolitycznych o wiele dłużej i dopiero po 14 dniach zaobserwowano silne zahamowanie ich wzrostu.

Bakterie fermentacji masłowej i z grupy *coli-aerogenes* były w kiszonkach mniej liczne niż bakterie proteolityczne i zahamowanie ich rozwoju nastąpiło w ciągu kilku pierwszych dni kiszenia.

Największe ilości drożdży znaleziono po 3 tygodniach, a po 2 miesiącach ilość ich spadła do połowy przy równoczesnym silnym spadku ilości bakterii kwaszących.

TABELA VIII

Doświadczenie III. Opis szczepów bakterii kwaszących

Experiment III. Characteristics of the strains of acidifying bacteria isolated from the silages

Nr szczepu Strain No	Wielkość komórek w μ Dimenssions of the cells	Wpływ t° na nasilenie rozwoju Influence of temperature on the growth					Wzrost w stężeniach NaCl % Growth in the presence of NaCl %				Redukcja błękitu metylenowego % Methylene blue reduction			Fermentacja Fermentation																Odczyn Vegas—Proskamera	Zakwaszenie pożywki płynnej w ciągu 3 dni do pH of the medium after 3 days of incubation	Uwagi: szczepy zbliżone do gatunku
		30°	35°	40°	45°	50	2	4	6,5	7,5	0,01	0,1	0,3	Glikozy	Fruktozy	Galaktozy	Mannozy	Sorbozy	Sacharozy	Maltozy	Laktozy	Rafinozy	Ramnozy	Arabinozy	Ksylozy	Skrobi rozp.	Sorbitolu	Mannitolu			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
														z i a r n i a k i — c o c c i																	
1	0,6 × 0,6	+++	+++	++	–	–	+++	+++	+++	+++	–	–	–	+++	+++	–	+++	–	–	–	+++	–	–	–	–	–	–	–	–	5,56	*S. parvulus*
2	0,7 × 0,7	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+	–	–	–	–	+++	++	–	+++	–	–	+++	+	–	–	+	–	–	–	+	++	4,46	*S. faecalis*
3	0,8 × 0,8	+++	+++	+++	++	–	+++	+++	++	+	–	–	–	+++	+++	–	–	–	–	+++	+	–	–	+	–	–	–	+	+	4,59	,,
4	1,1 × 1,3	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+	–	–	+++	+++	++	–	–	–	++	+	–	–	+	–	–	–	+	+	4,28	,,
5	0,6 × 0,7	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+++	–	–	++	+++	++	–	–	–	+++	++	–	–	+	–	+	–	+	++	4,27	
6	0,4 × 0,4	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	–	–	++	–	–	–	–	6,21	
7	0,4 × 0,7	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	–	–	+++	–	–	+++	+++	+++	+++	–	+++	+++	+++	–	–	–	++	–	–	–	+	4,53	*Strept. sp.* Long I Bliss I
8	0,8 × 1,1	+++	++	–	–	–	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	+++	++	+	–	+	+++	–	–	–	–	–	–	+	–	–	4,30	
9	0,8 × 0,8	+++	+++	+	–	–	+++	+++	+++	++	–	–	–	+++	+++	+++	+++	–	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++	–	–	–	5,24	*Strept. sp.* Long I Bliss II
10	0,5 × 0,8	+++	+++	+	–	–	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	+++	–	++	–	+++	+++	++	–	–	–	++	+	–	–	–	4,27	,,
11	0,8 × 0,8	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	–	–	–	++	+++	++	+++	–	–	+++	+	–	–	–	–	–	–	–	++	4,25	
12	0,6 × 0,6	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	++	–	–	++	+++	++	+++	–	–	+++	++	–	–	–	–	–	–	–	+++	4,25	
13	0,4 × 0,6	+++	+++	+	–	–	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	+++	–	++	–	+++	+++	++	–	–	–	+++	–	–	–	–	4,37	*S. lactis*
14	0,6 × 0,8	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+++	–	–	+++	+++	+++	++	++	–	+++	++	–	–	++	++	+++	++	++	–	4,39	
15	0,8 × 0,8	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	–	–	–	+++	+++	++	+	–	–	++	+	–	–	+	–	–	–	+	+	4,37	*S. faecalis*
16	0,7 × 0,8	+++	+++	++	+	–	+++	+++	+++	–	++	–	–	+++	++	++	++	–	–	++	++	–	–	+	–	–	–	+	+++	4,27	,,
17	0,8 × 1,1	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	++	–	–	+++	++	+++	++	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	++	4,30	
18	0,6 × 0,8	+++	+++	++	+	–	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++	++	+	++	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	++	4,59	
														p a ł e c z k i — r o d s																	
41	0,5× 2,3—3	+++	+++	++	+	–	+++	+++	++	–	+++	++	–	+++	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	+	–	4,84	*L. brevis*
42	0,6× 1,5—2,3	+++	++	–	–	–	+++	+++	–	–	+++	–	–	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	–	+	+	+++	–	+	+++	–	5,30	,,
43	0,4× 1,0—1,2	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+++	++	++	+++	++	–	+++	–	+++	+++	–	+	–	–	–	–	+	+++	–	4,82	
44	0,7× 1,5—2,3	+++	++	–	–	–	+++	++	–	–	+++	–	–	+++	+++	+	++	+	–	+	+	–	–	++	–	–	–	+	–	4,56	*L. brevis*
45	0,6× 1,2—1,9	+++	++	–	–	–	+++	+++	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	4,66	,,
46	0,6× 1,5—1,9	+++	+++	++	+	–	+++	+++	–	–	+++	++	++	+++	+++	+++		-	+++	+++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4,55	*L. delbrückii* lub *bifidus*
47	0,6× 1,5—1,9	+++	+++	+	–	–	+++	+++	–	–	+++	++	++	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	–	–	++	–	–	–	–	6,59	
48	0,6× 1,9—2,3	+++	+++	–	–	–	+++	+++	–	–	++	–	–	+++	+++	–	+++	–	+++	+++	–	–	–	–	–	+	–	–	++	+	4,75	
49	0,7× 2,3—3,0	+++	++	–	–	–	+++	+++	–	–	+++	+++	++	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	–	–	++	-	–	–	+	+	5,91	*L. bifidus*
50	0,7× 2,3—3,8	+++	+++	++	+	-	+++	+++	++	-	–	–	–	+++	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	+++	+++	+++	–	–	++	–	4,89	*L. brevis*
51	0,7× 1,1 1,5	+++	+++	++	+	-	+++	+++	–	-	+++	++	+	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	–	–	–	–	++	–	–	–	–	6,57	*L.leichmannii*

Objaśnienia znaków w kolumnie 3-11:
— brak wzrostu
+ słaby wzrost
++ silny wzrost
+++ b. silny wzrost

w kolumnie 12-14:
— nie redukuje błękitu metylenowego
+ redukuje słabo błękit metylenowy
++ redukuje silnie błękit metylenowy
+++ redukuje b. silnie błękit metylenowy

w kolumnie 15-29:
— brak kwaszenia
+ słabo kwasi
++ silnie kwasi
+++ b. silnie kwasi

w kolumnie 30:
— brak produkcji acetoiny
+ mała produkcja acetoiny
++ duża produkcja acetoiny
+++ b. duża produkcja acetoiny

Wyniki doświadczenia IV wykazują, że do ziemniaków można dodawać duże ilości ryby. Rozwój mikroflory kwaszącej w takich kiszonkach jest na ogół dobry. Przy większych dawkach ryby (20 - 30%) obserwujemy jednak znacznie mniejszą ilość bakterii kwaszących.

Doświadczenie ze zgniłą rybą zrobiono tu orientacyjnie. Należałoby je powtórzyć i otrzymane kiszonki zbadać wszechstronnie, zwłaszcza pod względem chemicznym i żywieniowym.

Porównano także przy pomocy testu *t* Studenta rozwój bakterii kwaszących w kombinacjach 1 i 2. Z uzyskanych liczb wynika, że pomiędzy tymi kombinacjami jest istotna różnica (wartości $t > 2{,}074$ przy 5-procentowym poziomie istotności). Podobnie jak w doświadczeniu I mimo tej różnicy otrzymano dobrą kiszonkę ziemniaczaną nawet gdy dodano do ziemniaków 30% ryby.

Wyniki analiz chemicznych kiszonek doświadczenia IV podano w tabeli VI.

Jak widać z tabeli VI we wszystkich kombinacjach doświadczenia IV kiszonki zawierały właściwe ilości kwasów organicznych. Oceniając je przy pomocy klucza Fliega otrzymujemy, bez względu na użytą kombinację, po 38 punktów, a więc oceniamy je jako bardzo dobre. Odznaczały się one przyjemnym kwaśnym zapachem. Kiszonka z 8% nadgniłej ryby nie miała odstręczającego zapachu. Swym zapachem przypominała ona nieco ser tylżycki.

Według Fliega (1938) kiszonki bardzo dobre nie mogą mieć więcej niż 8% N-amoniakalnego w stosunku do N-ogólnego. Kiszonki zawierające od 8 do 14% azotu amoniakalnego mogą być dobre lub złe, kiszonki zawierające ponad 14% azotu amoniakalnego są zawsze złe.

Rozpad białek do amoniaku w kiszonkach IV doświadczenia nie jest zbyt duży, szczególnie w kombinacjach 1 i 2, gdzie N-amoniakalny stanowi tylko około 6 - 7,5% azotu ogólnego. W kombinacji 3 procent ten jest wyższy i wynosi około 11,5. Kiszonki tego doświadczenia miały najmniej suchej masy w kombinacji 2, gdzie dodano największych ilości ryb. Zbyt duży, bo 30% dodatek ryby do ziemniaków powoduje mazistość kiszonki.

TABELA VII

Doświadczenie IV. Zmiany wartości *pH* w kiszonkach w czasie trwania kiszenia

Experiment IV. *pH* fluctuation during storage of the silage

Kombinacje Series	Wiek kiszonki w dniach Days of storage			
	1	5	8	60
1	5,50	4,80	4,60	4,05
2	5,50	4,80	4,66	4,05
3	—	—	4,90	4,22

Odczyn kiszonek oznaczano po 1, 5, 8 i 60 dniach fermentacji przy pomocy potencjometru wobec elektrody szklanej. Wyniki tych oznaczeń zebrano w tabeli VII.

Po 60 dniach przechowywania odczyn kiszonek doświadczenia IV był więc dostatecznie niski, aby zabezpieczyć je przed zepsuciem. W doświadczeniu tym obserwujemy we wszystkich kombinacjach powolny spadek odczynu kiszonek (po 8 dniach przechowywania *pH* wynosiło jeszcze około 4,6 - 4,9%).

Z całości przeprowadzonych prób wynikałoby, że zbyt duże dawki ryby (ponad 20%) powodują mazistość kiszonki i zwolnienie spadku *pH*, chociaż rozwój mikroflory kwaszącej przebiegał w nich względnie dobrze i wprawdzie z opóźnieniem, lecz powstawały korzystne ilości

TABELA IX

Doświadczenie IV. Opis wyodrębnionych szczepów bakterii kwaszących: wymiary komórek, zdolność kwaszenia i wytwarzania acetoiny

Experiment IV. Some characteristics of strains of acidifying bacteria isolated from the silage

Nr szczepu Strain No	Wymiary komórek w μ Dimensions of the cells μ	Odczyn Voges-Proskauera Voges-Proskauer test	Zakwasza w ciągu 3 dni pożywkę płynną do *pH* *pH* of the medium after 3-days incubation	Nr szczepu Strain No	Wymiary komórek w μ Dimensions of the cells μ	Odczyn Voges-Proskauera Voges-Proskauer test	Zakwasza w ciągu 3 dni pożywkę płynną do *pH* *pH* of the medium after 3-days incubation
ziarniaki — cocci				ziarniaki — cocci			
19	0,4× 0,4	—	3,88	34	0,4 × 0,5	—	3,95
20	0,6 × 0,8	—	3,95	35	0,4 × 0,5	—	3,90
21	0,6 × 0,8	—	4,00	36	0,4 × 0,5	—	3,90
22	0,5 × 0,6	—	3,85	37	0,4 × 0,6	—	3,95
23	0,6 × 0,8	—	3,95	38	0,7 × 0,7	—	3,85
24	0,4 × 0,6	—	3,90	39	0,7 × 0,8	—	3,87
25	0,5 × 0,6	—	3,95	40	0,6 × 0,8	—	3,80
26	0,6 × 0,7	±	3,65	pałeczki — rods			
27	0,6 × 0,8	±	3,72				
28	0,6 × 0,8	—	3,95	52	0,4 × 1,2 — 1,5	+++	4,24
29	0,5 × 0,6	—	3,86	53	0,4 × 1,3 — 1,5	++	5,20
30	0,6 × 0,7	±	3,74	54	0,6 × 1,5 — 2,3	—	4,32
31	0,5 × 0,7	—	3,95	55	0,5 × 2,3 — 3	—	4,00
32	0,5 × 0,6	++	3,90	56	0,6 × 1,5 — 3	—	4,28
33	0,6× 0,8	+++	3,78	57	0,6 × 0,8 — 2,3	—	4,22

kwasów organicznych. Szczególnie powolny spadek odczynu obserwujemy w kiszonce ze zgniłą rybą. W kiszonce tej utrzymywały się długo niekorzystne zespoły mikroorganizmów. Dane te nie zachęcają do stosowania nadgniłej ryby jako surowca kiszonkowego.

Ogółem wyodrębniono z kiszonek ziemniaczano-rybnych 57 szczepów bakterii kwaszących. 29 szczepów izolowano z kiszonek doświadczenia III i 28 z kiszonek doświadczenia IV.

Wyniki diagnozy wyosobnionych szczepów zestawiono w tabeli VIII. Żaden z wyosobionych szczepów ziarniaków i pałeczek nie rozrzedzał żelatyny i nie fermentował gliceryny. Wszystkie szczepy były gramododatnie.

W tabeli IX podano wyniki częściowej diagnozy 28 szczepów bakterii kwaszących wyosobnionych z kiszonek doświadczenia IV. Określono tu ich siłę kwaszenia i zdolność produkowania acetoiny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I OGÓLNE WNIOSKI

Z przeprowadzonych doświadczeń wynikałoby, że parowane ziemniaki można wzbogacać w białko zwierzęce, dodając do nich drobnicę rybną.

Uprzednie sparzanie ryby nie wydaje się nam potrzebne, sądząc z wyników doświadczenia I (tabela I, kombinacje 2 i 3).

Dodając do ziemniaków różne ilości ryby stwierdzono, że dawka jej może dochodzić do około 20%. Przy dawkach większych, np. 25 i 30% można otrzymać kiszonki o poprawnej zawartości kwasów organicznych i o przyjemnym aromacie. Kiszonki takie dojrzewają jednak wolniej i są zbyt maziste (tabela III i V), a przede wszystkim mogą się w nich nagromadzić różne niepożądane połączenia, co należałoby dokładnie sprawdzić.

Przyrządzania kiszonek z ryby nadpsutej należałoby unikać ze względu na długotrwały w nich rozwój bakterii proteolitycznych (tabela V).

Obserwując rozwój mikroflory w naszych kiszonkach z mniejszymi dawkami ryby (7,5 - 20%), stwierdzono na ogół prawidłowy rozwój bakterii kwaszących (tabela I, III i V). Szkodliwe mikroorganizmy z grupy *coli-aerogenes* i bakterii proteolitycznych ginęły po 5 - 6 dniach, a więc szybko ustępowały miejsca bakteriom kwaszącym, o ile tylko temperatura otoczenia wahała się w granicach 16 - 18° (porównaj doświadczenie II i IV). Wpływ temperatury na rozwój różnych grup mikroorganizmów w kiszonce należałoby zbadać w osobnym doświadczeniu.

Kiszonki, do których dodano 20% ryby miały ponad 5,0% białka surowego, około 2,3% kwasu mlekowego, 0,3% kwasu octowego i około 0,02% kwasu masłowego. Odznaczały się one zazwyczaj przyjemnym zapachem, z lekka przypominającym pastę rybną.

Racjonalne zużytkowanie na kiszonki paszowe tzw. „chwastu rybnego" i wszelkiej drobnicy rybnej nie nadającej się do spożycia przez człowieka może mieć duże znaczenie gospodarcze i to szczególnie w dużych obiektach rolnych połączonych z gospodarstwami rybnymi.

Serdeczne podziękowanie składam Prof. Dr Nauk Jadwidze Ziemięckiej za cenne rady i wskazówki, Prof. Dr Józefowi Kolowcy za użyczenie mi wyników analiz chemicznych kiszonek z dwóch pierwszych doświadczeń, Prof. mgr Wiktorowi Oktabie za cenne wskazówki przy opracowywaniu analizy statystycznej moich wyników i mgr Edwardowi Drzasowi za przeprowadzoną kontrolę zrobionych przeze mnie analiz chemicznych kiszonek doświadczenia III i IV.

LITERATURA

1. Bieriezowski A. A., 1951: Założyć bolsze siłosa w osiennij pieriod. *Sow. Zootiechnia*: 84.
2. Diewiatnin W. A., 1948: Witaminy: Piszczepromizdat. Moskwa.
3. Flieg O., 1938: Ein Schlüssel zur Bewertung von Gärfutterproben. *Futterbau u. Gärfutterbereitung*: 2.
4. Herzig J., 1946: Bramborova silaž, jeji priprava a zkrmovani, Brazda, Praha.
5. Kolowca J., 1953: „Chwast rybny" jako źródło białka w kiszonkach ziemniaczanych. W druku.
6. Kirsch W., Jantzon H., Sieden F., 1943: Konservierung von Fischen durch Einsäuerung mit Kartoffeln bzw. Ameisesäure (Amasil) und ihre Verwertung durch das Schwein. *Biedermanns Zbl.*, Abt. B, **15**: 209.
7. Lepper W., 1938: Einheitliche Apparat und einheitliche Gleichungen zur Bestimmung der Essig- und Buttersäure und Milchsäure in Sauerfutter, *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*, **1** : 187.

8. Łysogorow W. I., Sołtykow F. I., Warbicz O. A., 1951: Koncientrinowannyj siłos, *Sow. Zootechnia*; 64.
9. Morton R. A., Creed R. H., 1939: Die Umwandlung von Carotin in Vitamin A_2 durch Süsswasserfische, *Biochem. J.*, 33, wg *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*. 1940, **4** : 122.
10. Olsson N., 1942: Försök rörande fishprodukternas tillvaratagande och användbarhet som foder för höns och kycklingar, *Lantbrukshögskolan Husdjursförsöksanstalten, Medellande* Nr 7.
11. Schneider H. A., Ascham J. K., Platz B. R., Steenbock H., 1939: Die hautschützenden Eigenschaften verschiedener Nahrungsmittel, *J. Nutrition*, 18, wg *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*, **5** : 110.
12. Szember A., 1952: Kiszonki ziemniaczane i ich mikroflora, *Acta Microbiol., Polon.*, **1** : 339.
13. Szember A., 1954: Zarys rozwoju badań mikrobiologicznych nad kiszonkami paszowymi, *Acta Microbiol. Polon.*, **3** : 47.
14. Virtanen A. I., 1947: Silage by the A IV method, *The Economic Proc. Royal Dublin Soc.*, **3** : 311.

A. Szember

THE INFLUENCE OF THE ADMIXTURE OF FISH MEAT ON THE MICROFLORA OF POTATO SILAGES

Summary

It was the aim of the author to examine the effect of the enrichment of potato silages in protein contents by the admixture of fish meat on the development of microorganisms and on the quality of the product.

In this connection four experiments were conducted during years 1952 - 1955. The amount of added fish meat varied from 7,5 to 30%.

The numbers of acidifying bacteria, bacteria of *coli-aerogenes* group, proteolytic bacteria, butyric acid bacteria and yeasts were determined daily during the first 10-day period of fermentation of silages and after some weeks. The content of lactic, acetic and butyric acids and hydrogen ion concentration were measured at the same time.

The results of these investigations are given in tables I - VII and figures 1 and 2.

No detrimental effect of the admixture of fish meat up to 20% of potato weight was observed. The development of acidifying bacteria was normal and the growth of proteolytic bacteria, butyric acid bacteria and *coli-aerogenes* group was inhibited from the first days of fermentation onwards.

The value of *pH* fluctuated from the fourth day of fermentation between 4,3 and 4,2. On 60th day of fermentation following amount of acids were found in the silage: lactic acid — 2,3%, acetic acid — 0,35%, butyric acid — 0,02%. Feeding experiments were made in the Department of Animal Feeding (Kolowca 1953). The silages were shown to be of high value.

If more than 20% of fish meat (25% and 30%) was added the acidifying was delayed and the consistency of the silage was unfavorably changed.

There were isolated from examined silages many acidifying bacteria. Their characteristics are given in tables VIII - IX.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 401 - 410

S. Bujak i *A. Kasprzycka*

MIKROFLORA DROŻDŻOWA KISZONEK ZIEMNIACZANYCH

Z Zakładu Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 20 kwietnia 1956 r.

W poszczególnych badaniach wykazano, że kiszonki oprócz mikroflory kwaszącej zawierają również i inne grupy drobnoustrojów. Jakościowy i ilościowy skład mikroflory kiszonek zależy od wielu czynników, a między innymi od gatunku zakiszanych roślin i stopnia ich dojrzałości (Wöller 1927, Frölich 1926), sposobu przygotowania materiałów roślinnych do zakiszania (Glaubitz 1924, Ruschmann i Herder 1931, Virtanen 1947) oraz wieku kiszonki (Szember 1952, Zubrilin, Miszustin i Charczenko 1952, Löhnis 1935).

Pod wpływem drobnoustrojów w masie roślinnej poddanej procesowi zakiszania zachodzą zmiany struktury i składu chemicznego, warunkujące ze swej strony rozwój nowych zespołów mikroflory. Wśród drobnoustrojów towarzyszących głównej mikroflorze kiszonek zawsze stwierdzano obecność drożdży. Zubrilin i współpr. (1952), badając kiszonki sporządzone z kukurydzy i słonecznika znalazł największą ilość drożdży w początkowych okresach procesu zakiszania, przy czym zmiany ich ilości przebiegały równolegle do zmian ilości bakterii fermentacji mlekowej. Według Löhnisa (1935) najwięcej drożdży występuje w końcowym okresie fermentacji. Szember (1952) stwierdził, że w kiszonkach ziemniaczanych wzbogacanych dodatkiem koniczyny ilość drożdży wzrastała nawet po zakończonym procesie fermentacji (po ustabilizowaniu się *pH*). Ruschmann i Gräf (1932), badając skład jakościowy mikroflory drożdżowej występującej w kiszonkach, stwierdzili, że zależy ona od rodzaju zakiszonego surowca.

Stałe występowanie drożdży w kiszonkach nasuwało wniosek, że muszą one spełniać jakąś rolę w procesie zakiszania. W celu wyjaśnienia tego zjawiska wykonano szereg badań, które jednak dały wyniki w wielu przypadkach różniące się krańcowo od siebie. Ruschmann i Gräf (1952) szczepili materiały roślinne przygotowane do kiszenia kulturami bakterii fermentacji mlekowej i drożdży, przy czym wykazali korzystny wpływ takiej szczepionki na jakość otrzymywanej kiszonki. Inni badacze nie uzyskali tak dobrych wyników przy zastosowaniu szczepionek drożdżowych, co tłumaczyli zużywaniem cukru zawartego w materiale kiszonkowym do produkcji alkoholu, w wyniku czego bakteriom mlekowym brakowało substratu do produkcji kwasu mlekowego (Zubkowa 1955).

W badaniach Zubkowej przy użyciu szczepionki z dodatkiem drożdży do zakiszania kukurydzy i słonecznika osiągnięto $pH = 5{,}0 - 5{,}4$ (po 30 dniach fermentacji). Możliwe, że wpływ drożdży na jakość kiszonek zależy od rodzaju materiału użytego do ich sporządzenia. Jednak zdolność drożdży do wytwarzania substancji wzrostowych może także wpływać korzystnie na rozwój bakterii fermentacji mlekowej, a tym samym i na przebieg procesu zakiszania.

Wykazany przez Szembera (1952) ciągły wzrost ilości komórek drożdżowych w kiszonkach ziemniaczanych, widoczny nawet po zakończonym głównym procesie zakiszania, wymaga wyjaśnienia. Ziemniaki są wprawdzie surowcem bogatym w węglowodany, ale tylko w węglowodany złożone, których drożdże, nie mające na ogół enzymów amylolitycznych, nie mogą wykorzystywać jako źródła węgla. Znane są gatunki drożdży zdolne do wykorzystywania kwasów organicznych, kwasu mlekowego i octowego, jako jedynego źródła węgla. Drożdżom *Saccharomyces logos* i *Schizosaccharomyces pombe* przypisywano wprawdzie zdolność fermentowania dekstryn, lecz Steiger i Glaubitz (1933) wykazali, że pogląd ten jest niesłuszny. W tym samym roku Dühl (1933) jednak wyizolował z wycierki ziemniaczanej, z gleby, masła, serów i mleka grzybki drożdżowe, zdolne do hydrolizy skrobi. Według tego badacza aktywność diastatyczna tych grzybków wzrastała gdy hodowano je na pożywkach, w których jedynym źródłem węgla była skrobia.

BADANIA WŁASNE

CEL I ZAKRES BADAŃ

W związku z tym, że nadmierny rozwój drożdży w kiszonkach może wpływać niekorzystnie na procesy zakiszania, a w rezultacie i na jakość kiszonki, postanowiono bliżej zbadać przyczyny ciągłego przyrostu ilości komórek drożdżowych w kiszonkach ziemniaczanych wzbogacanych dodatkiem koniczyny. Jednocześnie celem pracy było poznanie składu mikroflory drożdżowej rozwijającej się w kiszonkach ziemniaczanych oraz pozyskanie szczepów zdolnych do rozkładu dekstryn.

W tym celu sporządzano kiszonki z samych ziemniaków oraz kiszonki ziemniaczane z dodatkiem koniczyny. Uparowane ziemniaki mieszano z koniczyną dla wzbogacenia ich w substancje azotowe i witaminy. Dodatek koniczyny miał jednocześnie odegrać rolę szczepionki, gdyż rodzima mikroflora ziemniaków ulega całkowitemu zniszczeniu w czasie parowania.

METODY BADAŃ

Umyte i uparowane pod normalnym ciśnieniem ziemniaki rozdrabniano na jednolitą masę i ubijano w sterylnych słojach o pojemności 2 litrów. Do ziemniaków ostudzonych do temperatury około 40° dodawano koniczynę w postaci sieczki, po czym dokładnie mieszano i ubijano w słojach. Powierzchnię ubitej masy zalewano parafiną w celu odcięcia dostępu powietrza i zahamowania rozwoju mikroflory tlenowej w powierzchniowych warstwach kiszonek.

Kiszonki ziemniaczane przygotowywano w następujących kombinacjach: 1) ziemniaki uparowane bez dodatku koniczyny, 2) z 5-procentowym dodatkiem suszonej koniczyny, 3) z 10-procentowym dodatkiem suszonej koniczyny.

Każdą kombinację wykonywano w dwóch równoległych powtórzeniach i w dwóch doświadczeniach. Przygotowane w opisany sposób kiszonki przechowywano w słojach w temperaturze 16 - 18°, przez okres 45 dni. Z przygotowanych kiszonek robiono posiewy na pożywkę dla drożdży po upływie 5, 12, 17, 24 i 33 dni od chwili zało-

żenia doświadczenia. Posiewy wykonywano w 6 powtórzeniach z następujących rozcieńczeń: 1 : 1 000, 1 : 10 000 i 1 : 100 000, po czym izolowano szczepy drożdży, które po uprzednim ich oczyszczeniu poddawano szczegółowym badaniom.

W badaniach tych określano następujące cechy diagnostyczne drożdży: 1) wytwarzanie *pseudomycelium* lub *mycelium*, 2) zarodnikowanie, 3) fermentowanie różnych cukrów, 4) wytwarzanie błonki na powierzchni pożywki płynnej, 5) kształt i wymiary komórek, 6) zdolność do wzrostu na różnych dekstrynach.

Wytwarzanie *mycelium* lub *pseudomycelium* badano na pożywkach agarowych z dodatkiem wyciągu ziemniaczanego lub wyciągu z marchwi (Lodder i Kreger — van Rij, 1952), wytwarzanie zaś zarodników na pożywce Gorodkowej.

Przy badaniu zdolności drożdży do fermentowania różnych cukrów zastosowano glikozę, galaktozę, sacharozę, maltozę i laktozę, dodając 2% badanego cukru do pożywki mineralnej. Fermentację przeprowadzano w probówkach z rurkami Durhama. Do wysiewu używano 24-godzinnej hodowli drożdży. Obserwacje gromadzenia się CO_2 w rurkach prowadzono w czasie od 24 godzin do 5 dni.

Zdolność drożdży do wytwarzania błonki na powierzchni pożywki płynnej obserwowano na brzeczce piwnej o gęstości 10° Blg. Zmiany w wyglądzie brzeczki obserwowano przez okres 5 dniu. Pomiary komórek dokonywano przy pomocy wyskalowanego mikrometru okularowego.

Zdolność drożdży do wzrostu na dekstrynach badano na pożywkach stałych, w których jedynym źródłem węgla były dekstryny wytrącone 57-, 73- i 85-procentowym roztworem alkoholu. Dekstryny wytrącone roztworami alkoholu oddzielano od płynu na sączku z bibuły filtracyjnej, następnie osad przemywano wodą destylowaną, rozpuszczano go ponownie w gorącej wodzie i wytrącano dekstrynę roztworem alkoholu. Dwukrotne wytrącenie dekstryn roztworem alkoholu miało na celu uwolnienie ich od cukrów prostych, wytwarzających się podczas hydrolizy skrobi. Otrzymane w opisany sposób dekstryny dodawano do pożywki o następującym składzie: 1 g dekstryny, 0,5 g fosforanu amonu, 100 ml wody wodociągowej, 1 ml wody drożdżowej. Zawiesinę drożdży z 24-godzinnej hodowli wysiewano na płytki z powyższą pożywką przy pomocy pipetek pasteurowskich. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28° przez okres 10 dni.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki uzyskane przy oznaczaniu ilości komórek drożdżowych w sporządzonych kiszonkach były zgodne z wynikami uzyskanymi przez Szembera (1952). Ilość komórek drożdżowych wzrastała zarówno w czasie głównego procesu fermentacyjnego jak i po zakończonym procesie zakiszania. Wyniki uzyskane w różnych okresach procesu zakiszania podano w tabeli I.

Z danych zawartych w tabeli I widać wyraźnie, że ilość komórek drożdżowych w kiszonkach ziemniaczanych wzrastała wraz z wiekiem kiszonek. W kiszonkach ziemniaczanych wzbogaconych dodatkami koniczyny zarówno w pierwszych dniach zakiszania jak i po 33 dniach jego trwania znajdowano większe ilości drożdży aniżeli w kiszonce bez dodatku koniczyny. Stwierdzono także, że ilość drożdży w kiszonce z 10% dodatkiem koniczyny była większa niż w podobnej kiszonce, lecz zawierającej mniej koniczyny. Po 33 dniach fermentacji różnice w ilości drożdży pomiędzy tymi kiszonkami dochodziły do 80% (tabela I, kolumna 3 i 4). Należało przypuszczać, że tak znacznym różnicom w ilości drożdży towarzyszą również i różnice w składzie chemicznym tych kiszonek, a zwłaszcza węglowodanów. Przypuszczenia te znalazły potwierdzenie w wynikach oznaczeń substancji redukujących wykonanych równolegle do posiewów próbek w poszczególnych okresach procesu zakiszania. Uzyskane dane zebrano w tabeli II.

W początkowym okresie fermentacji w kiszonce bez dodatku koniczyny nie wykryto obecności cukrów prostych. Dopiero po 17 i dalszych dniach jej trwania stwierdzono nieznaczną ilość tych substancji. W ki-

szonkach wzbogaconych dodatkiem koniczyny już w pierwszych dniach fermentacji ilość substancji redukujących była znaczna i wzrastała wraz z wiekiem kiszonki, zwłaszcza w kiszonce z 5% dodatkiem koniczyny. W kiszonce z 10% dodatkiem koniczyny ilość substancji redukujących, po osiągnięciu początkowo przeszło 8% w stosunku do suchej masy kiszonki, po 17 dniach fermentacji zmniejszała się do 4%, natomiast ilość komórek drożdży wzrastała we wszystkich kiszonkach przez cały okres badania.

TABELA I

Ilość komórek drożdżowych w 1 g kiszonki (w tysiącach)
Количество дрожжевых клеток в 1 г силоса (в тысячах)

Dni fermentacji Дни ферментации	Ziemniaki Картофель	Ziemniaki + 5% koniczyny Картофель + 5% клевера	Ziemniaki + 10% koniczyny Картофель + 10% клевера
5	1,8	4,5	6,2
12	80	110	130
17	230	450	620
24	580	700	1200
33	600	1000	1800

Po zestawieniu danych zebranych w tabeli I z danymi z tabeli II stwierdzamy brak wyraźnej zależności pomiędzy ilością znalezionych drożdży a zawartością substancji redukujących oraz wartością *pH* kiszonki.

Na podstawie uzyskanych danych nie można całkowicie wyjaśnić zagadnienia rozwoju drożdży w tych środowiskach. Nie wyjaśnione pozostały również przyczyny, dzięki którym ilość cukrów prostych w kiszonkach ziemniaczanych wzrastała z ich wiekiem. Być może, że w procesie hydrolizy skrobi brały udział następujące czynniki:

1) działanie kwasów organicznych zawartych w kiszonkach, dzięki którym odczyn kiszonek obniżył się do *pH* około 4,
2) działanie żywej mikroflory bakteryjnej,
3) obecność enzymów amylolitycznych, które wydostają się z obumarłych komórek bakteryjnych na skutek ich autolizy,
4) udział w procesie hydrolizy skrobi mikroflory drożdżowej,
5) obecność enzymów amylolitycznych pochodzących z dodanej koniczyny.

Udział kwasów organicznych obecnych w kiszonkach w procesie hydrolizy skrobi wydaje się mało prawdopodobny, jeżeli weźmiemy pod uwagę ich stosunkowo małe stężenie i słaby stopień dysocjacji oraz niską temperaturę kiszonek. Gdyby kwasowość kiszonek przyczyniła się do hydrolizy skrobi zakiszanych ziemniaków to należałoby oczekiwać,

że w kiszonkach o jednakowym lub zbliżonym poziomie *pH* będą znajdowały się jednakowe lub zbliżone ilości cukrów prostych. Tego jednakże nie stwierdzono. Stwierdzono natomiast, że pomimo niewielkich różnic w *pH* badanych kiszonek zawartość substancji redukujących w przeliczeniu na glikozę była w nich różna: nieznaczna w kiszonce bez dodatków, duża natomiast (ponad 8,0%) w kiszonkach wzbogaconych dodatkami koniczyny.

TABELA II

Ilość substancji redukujących w kiszonkach ziemniaczanych w różnych okresach ich fermentacji w przeliczeniu na glikozę (w procentach)

Количество редуцирующих веществ в картофельном силосе в разных периодах ферментации, представленное в % глюкозы

Dni fermentacji Дни ферментации	Ziemniaki Картофель			Ziemniaki + 5% koniczyny Картофель + 5 % клевера			Ziemniaki + 10% koniczyny Картофель + 10% клевера		
	sucha masa сухое вещество	substancje redukujące редуцирующие вещества	*pH*	sucha masa сухое вещество	substancje redukujące редуцирующие вещества	*pH*	sucha masa сухое вещество	substancje redukujące редуцирующие вещества	*pH*
5	24,93	0	5 6	27,70	3,18	4,6	31,32	5,13	4,4
12	25,23	0	4,8	26,50	4,27	4,2	30,34	8,78	4,2
17	24,47	ślady	4,4	27,89	3,54	4,0	31,33	8,67	4,1
24	24,70	0,2	4,2	27,62	5,61	3,9	31,58	3,60	4,2
33	24,45	0,42	4,2	27,47	6,93	4,0	31,17	4,11	4,1

Udział bakterii fermentacji mlekowej w hydrolizie skrobi byłby prawdopodobny, gdyby *pH* środowiska było wyższe, natomiast przy *pH* 4 procesy prowadzące do wytwarzania kwasu mlekowego są zahamowane, a zatem bakterie nie miałyby możliwości hydrolizowania skrobi. Być może, że w zjawisku tym brały udział drobnoustroje, których nie oznaczano w przeprowadzanych badaniach.

Wydaje się natomiast prawdopodobne, że w hydrolizie skrobi brały udział, między innymi czynnikami, również enzymy amylolityczne martwych komórek bakterii. Enzymy te wydostawały się z martwych komórek bakterii na skutek ich masowego zamierania i następnie autolizy.

Szember wykazał, że po 5 dniach fermentacji ilość bakterii zmalała o 50%, po 42 dniach o 98,5%. Być może, że w procesie tym brały udział również i drożdże, zwłaszcza przy rozszczepianiu dekstryn. Niewykluczony jest również i udział enzymów amylolitycznych zawartych w dodawanej koniczynie.

Iljin (1924) i Haehn (1926) wykazali, że skrobia może ulegać hydrolizie nawet pod wpływem działania obojętnych soli mineralnych, przy czym stwierdzili, że najintensywniej działają chlorki. Jednak według Iljina szybkość hydrolizującego działania chlorków uzależniona jest od stężenia skrobi. W roztworach skrobi o stężeniu 0,5% szybkość ta jest bar-

TABELA III

Własności morfologiczne wyizolowanych szczepów drożdży
Морфологические свойства изолированных штаммов дрожжей

Nr szczepu № штамма	*Pseudo mycelium* Псевдо мицелий	Zarodnikowanie спорообразование	Wymiary komórek размер клеток	Tworzenie kożucha образование пленки
1	–	+	8,4 × 4,4	–
2	–	+	8,4 × 4,4	–
3	–	–	5,3 × 3,2	–
4	+	–	7,3 × 3,0	+
5	+	–	7,3 × 3,0	
6	–	+	8,4 × 4,4	–
7	–	+	8,4 × 4,4	–
8	+	–	7,3 × 3,0	+
9	+	–	7,3 × 3,0	+
10	–	+	8,4 × 4,4	–
11	+	–	7,3 × 3,0	+
12	–	–	5,3 × 3,2	–
13	–	+	8,4 × 4,4	–
14	–	+	8,4 × 4,4	–
15	–	+	8,4 × 4,4	–
16	+	–	7,3 × 3,0	+
17	–	+	8,4 × 4,4	–
18	+	–	7,3 × 3,0	+
19	–	–	8,4 × 4,4	–
20	+	–	7,3 × 3,0	+
21	+	–	7,3 × 3,0	+
22	+	–	7,3 × 3,0	+
23	–	+	8,4 × 4,4	–
24	+	–	7,3 × 3,0	+
25	+	–	7,3 × 3,0	+
26	–	–	5,3 × 3,2	–
27	+	–	7,3 × 3,0	+
28	+	–	7,3 × 3,0	–
29	+	–	7,3 × 3,0	+
30	+	–	7,3 × 3,0	+
31	–	–	7,3 × 3,0	+

Objaśnienie: szczepy wytwarzające zarodniki lub *pseudomycelium* oznaczono znakiem plus (+), nie wytwarzające znakiem minus (–).

dzo mała, a dopiero przy małych stężeniach sól kuchenna działa hydrolizująco nawet w bardzo rozcieńczonych roztworach (M/500).

Według Haehna działanie hydrolityczne chlorków wzmaga się przy dodatku aminokwasów a głównie alaniny i l-leucyny. Zdaniem tego badacza udział drobnoustrojów w tych doświadczeniach był wykluczony.

TABELA IV

Wykorzystywanie węglowodanów przez wyizolowane drożdże

Использование углеводов изолированными дрожжами

Nr szczepu Но штамма	Glikoza	Maltoza	Sacharoza	Laktoza	Galaktoza	Achrodekstryna	Erytrodekstryna	Amylodekstryna
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	+++	++	+++	–	++	–	–	–
2	++	+++	+++	–	++	–	–	–
3	++	–	++	–	+++	+++	+++	+++
4	+	–	–	–	–	+	+	+++
5	+	–	–	–	–	–	–	–
6	+++	+	+++	–	++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	–	–	–	–	–
8	+	–	–	–	–	+	+	+
9								
10	+++	+	+++	+	+	–	–	–
11	+	–	–	–	–	+	–	–
12	++	–	+++	–	–	+	+	–
13	+++	+	+++	–	+++	+++	+	+
14	+++	+	++	–	++	+	–	–
15	+++	+	+++	–	+++	+	+	–
16	–	–	–	–	–	+++	+++	+++
17	+++	++	+++	–	–	–	–	–
18	+	–	–	–	–	+++	+	+
19	+++	–	+++	–	–	+	–	–
20								
21								
22	+++	–	+++	–	–	+	–	–
23								
24								
25	+	–	–	–	–	+++	+	+
26	++	–	–	–	–	+++	+	+
27								
28								
29								
30								
31	+	–	–	–	–	+++	+	+

Przytoczone wyniki badań różnych autorów wskazują, że hydrolizę skrobi w kiszonkach ziemniaczanych może wywoływać nie tylko jeden czynnik, lecz cały ich zespół. Zagadnienie to jest więc bardzo skomplikowane i wymagałoby odrębnych, szczegółowych badań.

Z kiszonek wyizolowano 31 szczepów drożdży, które poddano szczegółowym badaniom. Wyniki badań nad właściwościami wyizolowanych szczepów drożdży zebrano w tabeli III. *Pseudomycelium* wytwarzało około 50% tych szczepów, zarodnikowało zaś mniej, bo tylko około 30%. Szczepy te zarodnikowały już po 48 godzinach hodowli, tworząc 1 - 4 błyszczących zarodników o kształcie kulistym, ułożonych w różny sposób.

Błonę na powierzchni pożywki płynnej wytwarzały tylko szczepy niezarodnikujące. Komórki ich miały kształt wydłużony, a wewnątrz zawierały zwykle dwie kropelki tłuszczu rozmieszczone na biegunach komórki. Błona na powierzchni pożywki była koloru białego, matowa, pomarszczona na powierzchni i wchodziła na ścianki probówek (tabela III, nr 4, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30).

Niektóre szczepy niezarodnikujące nie wytwarzały błonki na powierzchni płynnej pożywki, lecz tylko pierścień na ściankach probówek na granicy zetknięcia się powierzchni pożywki z powietrzem i ściankami probówek. Komórki tych szczepów były bardziej kuliste i znacznie mniejsze (tabela III, nr 3, 12, 26).

Najsilniej fermentowały, zwłaszcza glikozę i sacharozę, szczepy zarodnikujące. Szczepy te fermentowały wymienione cukry już po 24 godzinach. Żaden z wyizolowanych szczepów drożdży nie fermentował laktozy, galaktozę fermentowało 26% szczepów, maltozę 30%, sacharozę zaś około 45% (tabela IV).

Wzrost na pożywkach, w których jedynym źródłem węgla były dekstryny, wykazywały przeważnie szczepy niezarodnikujące. Największa ilość szczepów wyrastała na pożywce z dekstryną o najniższym ciężarze cząsteczkowym, wytrącaną w 85-procentowym roztworze alkoholu. Obserwowany wzrost był słaby, lecz być może, że przyczyną tego była niedostateczna ilość substancji wzrostowych, dostarczonych w postaci wody drożdżowej. Dodawanie większej ilości wody drożdżowej budziło obawy jednoczesnego wprowadzenia cukrów prostych.

Na podstawie badań nad właściwościami wyizolowanych szczepów drożdży można stwierdzić, że szczepy nr 1, 2, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 17 i 23 podobne były do rodzaju *Saccharomyces*. Szczepy nr 3, 12, 19, 26 i 31 zbliżone były do rodzaju *Torulopsis*, szczepy zaś nr 4, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29 i 30 podobne do rodzaju *Mycoderma* (Jørgensen 1947).

* * *

Otrzymane wyniki można zreasumować jak następuje.

1. Ilość komórek drożdży w 1 g badanych kiszonek wzrastała wraz z wiekiem kiszonki i wielkością dodatku koniczyny.

2. Zawartość cukrów prostych w kiszonkach ziemniaczanych wzrastała w większości przypadków wraz z wiekiem kiszonki i wielkością dodatku koniczyny.

3. Wyizolowane szczepy drożdży były zbliżone do następujących rodzajów: do rodzaju *Saccharomyces* szczepy nr 1, 2, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 17

i 23; do rodzaju *Torulopsis* szczepy nr 3, 12, 19, 26 i 31; do rodzaju *Mycoderma* szczepy nr 4, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29 i 30.

4. Wśród wyizolowanych szczepów drożdży znajdowały się szczepy zdolne do wzrostu na dekstrynach (tabela IV).

LITERATURA

1. Dühl A., 1933: Diastase bildende Bakterien (unter besonderer Berücksichtigung der Milchsäurebakterien) und Hefen. *Zentr. Bakter. II*, **88** : 81.
2. Fröhlich G., 1926: Wpływ dodatku płatków ziemniaczanych do kiszonki. *Deutsche Landw. Presse*, wg *Przemysłu Rolnego*, **3** : 270.
3. Glaubitz M., 1926: Jak powinno się sporządzać kiszonki z ziemniaków? Biologia kiszenia ziemniaków. *Zeitschr. f. Spiritusind.*, wg *Przemysłu Rolnego*, **3** : 171.
4. Haehn H., 1926: Hydroliza krochmalu przez substancje obojętnie działające amylolitycznie. *Zeitschr. f. Spiritusind.*, wg *Przemysłu Spożywczego*, **2** : 176.
5. Iljin W. S., 1924: Über den Abbau der Starke durch Salze. *Biochem. Zeitschr.*, **145** : 14.
6. Jørgensen A., 1948: Microorganisms and Fermentation. Charles Griffin and Comp., London.
7. Lodder J. and Kreger — van Rij N. J. W., 1952: The Yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
8. Löhnis F., 1935: Vorkommen u. Tätigkeit von Mikroorganismen in den Futtermitteln, Handbuch der Landwirtschaftliche Bakteriologie, P. Parey, Berlin.
9. Ruschmann G. u. Gräf G., 1932: Vorkommen und Bedeutung von Hefen im Silosfutter. *Zentr. Bakter., II*, **85.**
10. Ruschmann G. u. Harder L., 1931: Vorkommen von Buttersauerbakterien im Silosfutter. *Zentr. bakter., II*, **85.**
11. Steiger u. Glaubitz., 1933: Über Dekstrinvergärende Hefen. *Zeitschr. Spiritusind*, **36** : 190.
12. Szember A., 1952: Kiszonki ziemniaczane i ich mikroflora. *Acta Microbiol. Polon.*, **1** : 339.
13. Virtanen A. J., 1947: Silage by the AJV method. *Econ. Proc. Roy., Soc. Dublin.* **3** : 311.
14. Wöller H., 1927: Über die epiphytische Bakterienflora gesunder grüner Pflanzen. *Zentr. Bakter. II*, **79** : 173.
15. Zubrilin A., Miszustin E. N., Charczenko W. A., 1952: Kiszonki. (Tłumaczenie z rosyjskiego). PWRiL, Warszawa.
16. Zubkowa D., 1955: Rol drożżej w silosowanii kormow. *Mikrobiołogija*, **24** : 353.

С. Буяк и *А. Каспшицка*

ДРОЖЖЕВАЯ МИКРОФЛОРА КАРТОФЕЛЬНЫХ СИЛОСОВ

Резюме

Для установления факторов влияющих на количество дрожжей в картофельном силосе и состав дрожжевой микрофлоры авторами исследовано картофельный силос с прибавкой 5% и 10% клевера и без прибавок.

Количество дрожжевых клеток увеличивается во время ферментации. Количество дрожжей повышается под влиянием прибавки клевера (Табл. I).

Концентрация редуцирующих веществ повышается во время ферментации. В силосах с прибавкой клевера веществ этих значительно больше. (Табл. II).

Не обнаружено корреляции между количеством дрожжей и концентрацией редуцирующих веществ.

Изолированы 31 штаммы дрожжей: номера 1, 2, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 17, 23 *Saccharomyces sp.*, номера 3, 12, 19, 26, 31. — *Torulopsis*, номера 4, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 30 — *Mycoderma*.

Некоторые штаммы способны разлагать декстрины (Табл. IV).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 411 - 415

K. A. Bogdański i *A. Ziołecki*

WŁASNOŚCI PEKTOLITYCZNE NIEKTÓRYCH SZCZEPÓW PLEŚNI W ZASTOSOWANIU DO KLAROWANIA MOSZCZÓW

Z Katedry Technologii Odżywek i Koncentratów Witaminowych Politechniki w Łodzi
Z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Bydgoszczy

Wpłynęło dnia 3 marca 1956 r.

Klarowanie świeżo wyciśniętych moszczów jest zazwyczaj bardzo utrudnione na skutek obecności polimerów pektynowych, zwiększających znacznie lepkość moszczu i stabilizujących zawiesinę drobnych cząsteczek, będących przyczyną zmętnienia. Przeciwdziała się temu stosując preparaty klarujące, uzyskane z pleśni i zawierające jako główny składnik czynny enzym pektynazę. Preparaty te hydrolizują pektyny na kwasy galakturonowe, obniżając tym samym znacznie lepkość moszczu i ułatwiając filtrowanie lub samoczynnie sklarowanie.

W piśmiennictwie polskim znajdujemy niewiele prac poświęconych zagadnieniom wytwarzania preparatów pektolitycznych. Należy tu wymienić przede wszystkim obszerne badania Rzędowskiego (1953) nad opracowaniem metod otrzymywania preparatów enzymatycznych z pleśni *Aspergillus niger*, a także pracę Salmonowicza (1950) poświęconą temu samemu zagadnieniu.

Celem pracy niniejszej było zbadanie przydatności kilkunastu gatunków pleśni do produkcji preparatów klarujących. Badania wykonano w latach 1952 - 1953, nie można więc było wykorzystać metod otrzymywania preparatów opracowanych przez Rzędowskiego.

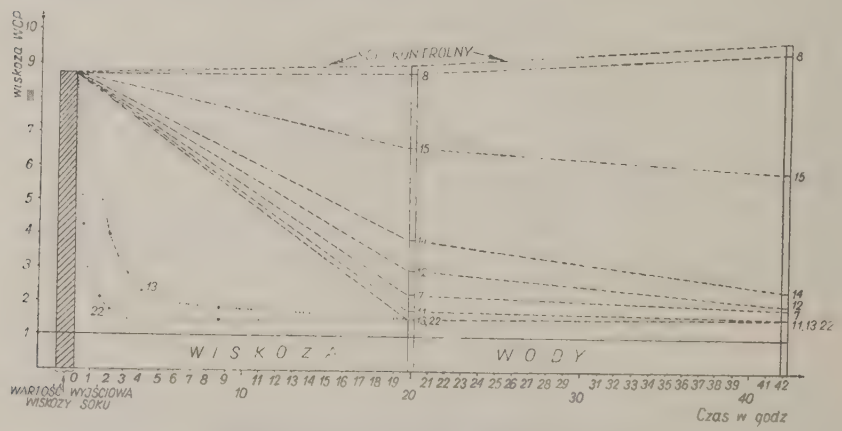
MATERIAŁ I METODY

a) Szczepy badane. Zbadano własności pektolityczne 27 szczepów pleśni, pochodzących z kolekcji czystych kultur Pracowni Mikrobiologicznej Instytutu Fizjologii w Bydgoszczy. 6 z nich zostało wyeliminowanych już przed wykonaniem pomiarów wiskozymetrycznych z powodu zbyt niskiej wydajności preparatu.

1. *Aspergillus niger* nr 67
2. *Aspergillus niger* nr 599
3. *Aspergillus niger* nr 3
4. *Aspergillus flavus* szczepy nr 484
5. *Aspergillus oryzae* szczepy nr 458
6. *Penicillium cazeicolum* Bainier
7. *Aspergillus Wenti* Wehmer
8, 10, 12. *Aspergillus niger* v. Tiegh. — 3 szczepy

9. *Aspergillus niger mut. fusca* Blochw.
11. *Aspergillus niger f. Tübingen* Schober
13. *Aspergillus niger var. altipes* Schiem.
14. *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn
15. *Aspergillus flavus* Link
16. *Aspergillus glaucus mut. alba* Blochw.
17. *Aspergillus citrisporus* v. Höhn.
18. *Aspergillus candidus* Link
19. *Aspergillus clavatus* Desm. *mut. gigantea* Wehmer
20. *Aspergillus Amstelodami* (Mang.) Thom & Church
21. *Mucor flavus*
22. *Mucor piriformis*
23. *Rhizopus oryzae*
24. *Penicillium citrinum* Thom
25. *Penicillium brevi-compactum* Dierkx
26. *Penicillium luteum* Zukal
27. *Penicillium aurantis brunneum* Dierckx

b) Sporządzanie preparatów pektolitycznych. W celu uzyskania preparatów szczepy hodowano na wyciągu z marchwi, zakwaszonym kwasem cytrynowym do *pH* 4,5. Hodowle przeprowadzano w kolbach Roux o pojemności 1 litra, w których znajdowało się po 200 ml pożywki. Szczepienia dokonywano zawiesiną zarodników. Po 10-dniowej inkubacji w temperaturze 28° zawartość kolb (tzn. grzybnię wraz z pożywką) homogenizowano w homogenizatorze elektrycznym typu „Cyklon" i suszono w suszarce z ciągłym przepływem powietrza przy 40° przez 20 - 24 godzin, a następnie dosuszano w eksykatorze nad $CaCl_2$. Wysuszone preparaty rozcierano w moździerzu.



Wykres 1. Działanie preparatów w 20°.
Рис. 1. Действие препаратов в 20°

c) Oznaczanie aktywności pektolitycznej preparatów. Aktywność pektolityczną preparatów enzymatycznych z badanych pleśni oznaczano metodą wiskozymetryczną, przy zastosowaniu wiskozymetru Höpplera. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach, podając jedynie wyniki średnie w tabelach i wykresach. W pierwszej serii doświadczeń jako substratu użyto soku jabłkowego z odmiany „Koraliki",

w drugiej z odmiany „Graffenstein", a w trzeciej z odmiany „Kronselska". W wyborze odmian kierowano się możliwie wysoką naturalną lepkością soku. Preparaty dodawano w ilości 1 g na litr soku. Pektolizę przeprowadzano w temperaturach: 20 i 40°. Następnie sok zlewano do rurki centralnej wiskozymetru i przeprowadzano pomiar. Absolutną lepkość w centipoisach obliczano następnie według wzoru:

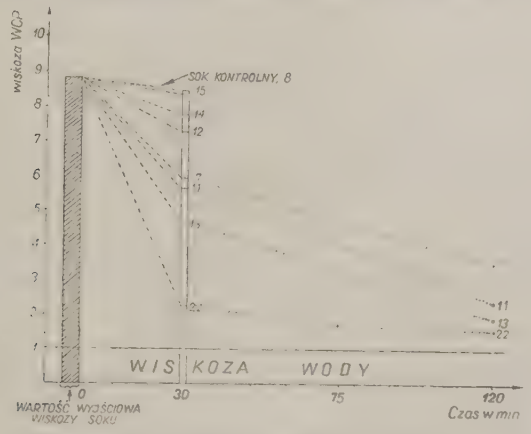
$$W = F\,(S_k - S_f)\,K,$$

gdzie F oznacza czas spadania kuli
S_k ciężar właściwy kuli w 20°
S_f ciężar właściwy płynu
K stałą kuli wyznaczoną fabrycznie.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W pierwszych dwóch seriach badań dokonano selekcji szczepów, wykazujących największą aktywność pektolityczną. Hodowlę, dla uzyskania preparatów, przeprowadzano po dwukrotnym przeszczepieniu adaptatywnym. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

W wyniku tych prób wyselekcjonowano 8 najaktywniejszych szczepów *, z których po sześciokrotnym przeszczepieniu na podłożu pektynowym według E h r l i c h a (1937) sporządzono ponownie preparaty. Wyniki badań nad tymi preparatami przedstawiono na wykresie 1 i 2.



Wykres 2. Działanie preparatów w 40°.
Рис. 2. Действие препаратов в 40°

Jak widać, aktywność pektolityczna preparatów, będąca miarą zawartości czynnych enzymów, wzrosła znacznie w wyniku dłuższego przystosowywania do właściwego podłoża. Znajduje to wyraz nie tyle w wartościach granicznych lepkości co w czasie, w jakim te wartości osiągnięto.

* Wśród nich znajduje się preparat nr 15 nie uwidoczniony w tabelach I i II, gdyż otrzymano go później.

TABELA I

Spadek lepkości soku jabłkowego pod wpływem działania preparatów pektolitycznych. Seria I.
(Lepkość podano w centipoisach)

Снижение вискоза яблочного сока под влиянием пектолитических препаратов.
Серия I. (Величина вискоза в центипоисах)

Czas i temperatura działania / Numer szczepu	5	6	7	11	12	13	14	19	23	Sok kontrolny
30 minut w 20°	11,7	11,8	10,9	10,7	10,7	10,6	11,1	11,4	11,7	11,8
30 minut w 40°	11,6	11,8	10,6	10,5	10,5	10,5	10,8	11,6	11,9	12,0

TABELA II

Spadek lepkości soku jabłkowego pod wpływem działania preparatów pektolitycznych. Seria II.
(Lepkość podano w centipoisach)

Снижение вискоза яблочного сока под влиянием пектолитических препаратов.
Серия II. (Величина вискоза в центипоисах)

Czas i temperatura działania / Numer szczepu	1	2	3	4	8	9	16	17	22	25	26	27	Sok kontrolny
30 minut w 20°	11,8	12,0	12,1	12,5	11,3	11,8	12,4	11,8	11,6	11,6	11,9	11,8	11,8
2 doby w 20°	7,2	10.7	5,1	10,9	2,1	11,3	11,4	11,4	1,6	10,6	10,3	10,2	11,2
30 minut w 40°	11,6	11,8	11,0	12,0	10,4	11,9	12,0	11,8	11,7	11,9	11,8	11,7	11,8

Intensywność procesu hydrolizy jest przy tym największa w początkowej reakcji, słabnąc w miarę ubywania substratu.

Rozpatrując pokrótce przebieg reakcji w temperaturze 20°, przedstawiony na wykresie 1 (najaktywniejszy preparat nr 22), i przyjmując, że substancje pektynowe zawarte w soku zostają w trakcie reakcji shydrolizowane w 100%, możemy stwierdzić, że w ciągu pierwszych 30 minut hydrolizie ulega 62,5% substancji pektynowych, w ciągu 75 minut — 91,7%, w ciągu dwóch godzin — 97,2%. Całkowita hydroliza następuje po upływie 8,5 godzin.

W temperaturze 40° w ciągu pierwszych 30 minut następuje spadek lepkości o 90,2%, w ciągu 75 minut o 98.6%, a w ciągu 2 godzin zostaje osiągnięta wartość graniczna.

W praktycznym stosowaniu preparatów oznacza to, że proces pektolizy przy 20° po 2 godzinach, a przy 40° po 75 minutach można uważać za ukończony.

Aktywność preparatów jest zatem bardzo wysoka, a szczepy z których je sporządzono nadają się doskonale do produkcji preparatów klarujących, obniżających w krótkim stosunkowo czasie lepkość moszczów niemal do lepkości wody.

Z pomiędzy badanych szczepów najwyższą aktywnością pektolityczną odznaczał się szczep nr *22 Mucor piriformis* oraz dwa szczepy *A. niger* nr *11* i *13*. *M. piriformis* wykazuje jeszcze tę zaletę, że nawet surowe preparaty sporządzone z tego szczepu nie barwią moszczu, co zachodzi przy stosowaniu preparatów z *A. niger*.

LITERATURA

1. Ehrlich F., 1937: Zur Kenntnis der Pektolase. *Enzymologia*, **3** : 185.
2. Rzędowski W., 1953: Opracowanie metod otrzymywania enzymatycznych preparatów do klarowania moszczów i win. *Prace Gł. Inst. Przem. Roln. i Spoż.*, **3** : 9.
3. Salmonowicz J., 1950: Produkcja enzymów pektolitycznych z pleśni *Aspergillus niger*. Uniwersytet Poznański, Zakład Technologii Rolnej w Poznaniu (maszynopis).

К. А. Богданьски и *А. Зиолецки*

ПЕКТОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБКОВ

Резюме

Авторами испытывались пектолитические свойства 27 штаммов плесневых грибков по их пригодности к продукции препаратов очищающих яблочное сусло.

Проверено действие самых активных из них. Самые сильные пектолитические свойства оказались у одного штамма *Mucor piriformis* а также у двух штаммов *Aspergillus niger*.

SKOROWIDZ AUTORÓW DO VOL. V

Albrycht M. — patrz Meisel i Albrycht H.
Bagdasarian G.: Metoda badania metabolizmu ogólnego drobnoustrojów. Doniesienie 102
Bagdasarian G., Hulanicka D., Kleczkowska H., Kłopotowska T. i Wiaterowa A.: Badania nad przemianą materii maczugowców błonicy. Doniesienie. I. 104
Badgasarian G., Michalska K., Odrzywolska A., Łuczewska J.: Badania podłoży bakteryjnych i standaryzacja zawiesin za pomocą metody oksytropii. Doniesienie 102
Bagdasarian G., Michalska K. i Odrzywolska A.: Badania nad współczynnikiem ekonomicznym i szybkością zużycia substratów przez drobnoustroje metodą oksytropii. Doniesienie. 103
Bagdasarian G. i Odrzywolska A.: Zastosowanie metody badania oksytropii substratów bakteryjnych dla obserwacji wpływu antybiotyków. Doniesienie. 103
Balicka N. i Sobieszczański J.: Żywotność *Escherichia coli* w glebie nawadnianej ściekami miejskimi 207
Balicka N. i Trzebiński M.: Aktywność enzymatyczna i obecność witaminy B_2 w glebie 377
Baranowska J. i Shugar D.: Rola białek w metodyce i w lokalizacji barwienia Gramem drobnoustrojów 100
Ber A. i Dryzek L.: O czynnikach wzrostowych dla *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzanych przez *Penicillium*. Doniesienie. 99
Ber A. i Zieleniewski J.: Wpływ antybiotyków na regenerację. I. Wpływ penicyliny białej krystalicznej i dwuhydrostreptomycyny na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daudin. Doniesienie. . . . 99
Ber A. i Zieleniewski J.: Wpływ penicyliny żółtej i białej, dwuhydrostreptomycyny i wyciągów wodnych z suszu grzybni pofermentacyjnej *Penicillium chrysogenum Q 176* na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin. Doniesienie. 100
Bogdański K. A. i Ziołecki A.: Własności pektolityczne niektórych szczepów pleśni w zastosowaniu do klarowania moszczów 411
Bujak S. i Kasprzycka A.: Mikroflora drożdżowa kiszonek ziemniaczanych 401
Burbianka M.: Własności antygenowe „enterotoksyny" — czynnika toksycznego, występującego w hodowlach gronkowców 245
Chodkowski A. — patrz Parnas J. i Chodkowski A
Czerwińska E. i Kowalik R.: *Penicillia* niszczące papier zabytkowy 299
Czerwińska E. — patrz Kowalik R. i Czerwińska A.
Dłużewski M. Charakterystyka drożdży wywołujących fermentację syropów owocowych i stężonego soku gronowego 241
Dobrzański R. — patrz Paluch J. i Dobrzański R.
Drożański W.: Śmiertelne zakażenie bakteryjne u pełzaków glebowych 315
Duda J.: Zastosowanie metody głębinowej w hodowli azotobaktera . . . 113
Dygdała K. — patrz Kunicki-Goldfinger W. i inni
Filipowicz J. — patrz Paluch J. i inni
Gańczarczyk J. — patrz Joszt A. i Gańczarczyk J.
Gańczarczyk J. — patrz Joszt A. i inni
Gąsior E. — patrz Sakławska-Szymonowa O. i Gąsior E.

Gołębiowska J.: Metoda badania zespołów mikroflory glebowej czynnej przy przemianach związków fosforowych w glebie 125
Gołębiowska J. i Wróbel T.: Występowanie promieniowców antagonistycznych w różnych glebach 137
Gołębiowska J. — patrz Mieczyńska A. i Gołębiowska J.
Gołębiowska J. — patrz Wróbel T. i Gołębiowska J.
Gromska W. — patrz Moycho W. i Gromska W.
Horoszewicz A. i Horoszewicz J.: Obserwacje nad wpływem penicyliny i innych antybiotyków na postacie *L Proteus mirabilis* 9
Horoszewicz J. — patrz Horoszewicz A. i Horoszewicz J. 9
Horubała A.: Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych do usuwania drobnoustrojów z surowców owocowych i warzywnych. Badania wstępne. 263
Hulanicka D. — patrz Bagdasarian G. i inni
Jakubczyk T.: Studia nad zastosowaniem próby reduktazowej do warzyw i produktów warzywnych 259
Jakubowska J.: Wyodrębnienie i diagnostyka bakterii czynnych w tworniku octowym. Doniesienie. 306
Jakubowska J., Oberman H. i Nowakowska A.: Mikrobiologiczne badanie kazeiny włókienniczej. Doniesienie. 304
Janczura E. i Piasecka-Aleksandrowicz J.: Wykorzystanie siarki i kwasu glutaminowego przez szczep PW_8 maczugowca błonicy. Doniesienie. 105
Jankun A.: Wyosobnienie i zbadanie szczepu drożdży „Brusznica 7". Doniesienie. 303
Janota H.: Powiązanie anabolizmu z katabolizmem u *Pseudomonas extorquens Bassalik*. Doniesienie. 104
Januszewicz J.: Biosynteza dekstranu przez różne szczepy *Leuconostoc mesenteroides* 217
Jarmolińska A. i Shugar D.: Barwienie i działanie różnych enzymów na bakterie termofilne żywe i zabite wysoką temperaturą. Doniesienie. 101
Joszt A. i Gańczarczyk J.: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych w tlenowych warunkach rzeki. Doniesienie. 211
Joszt A., Gańczarczyk J.: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych metodą osadu czynnego. Doniesienie. 213
Jurkowska H. — patrz Lityński T. i inni
Kałużewski S.: Badania nad odczynem fosfatazowym w różnych gatunkach bakterii 95
Kasprzycka A. — patrz Bujak S. i Kasprzycka A.
Kleczkowska H. — patrz Bagdasarian G. i inni
Kluczycki K.: Standardowe kultury grzybów drzewnych do badania wartości grzybobójczej i grzybochronnej. Doniesienie. 305
Kluczycki K.: Znaczenie doboru biocenoz swoistych do oczyszczania ścieków przemysłowych. Doniesienie. 214
Kłopotowski T. — patrz Bagdasarian G. i inni
Kocwa E.: Wpływ penicyliny na wytwarzanie acetonu przez *Clostridium acetobutylicum* 231
Kowalik R. i Czerwińska E.: Mikroorganizmy niszczące tkaniny bawełniane i wełniane 291
Kowalik R. i Sadurska I.: Mikroflora niszcząca papier, skórę i pieczęcie woskowe, występująca w powietrzu magazynów archiwalnych . 277
Kowalik R. i Sadurska I.: Mikroorganizmy niszczące oprawy książkowe ze skóry 285
Kowalik R. — patrz Czerwińska i Kowalik R.
Kovats J.: Bakteriofagi w fermentacji acetonowobutylowej 225
Kunicki-Goldfinger W., Dygdała K., Łagowska M., i Wiercieńska D.: Formy gonidialne bakterii 41
Kunicki-Goldfinger W., Dygdała K., Łagowska M. i Wiercieńska D.: Wpływ chlorku litu na pałeczkę okrężnicy 33
Kunicki-Goldfinger W. – patrz Kwiatkowski Z. i inni.
Kurzepa H.: *Acetobacter xylinum* jako ilościowy wskaźnik kwasu pantotenowego. Doniesienie. 106
Kwapiński J.: Badania nad budową antygenową maczugowca błonicy 321

Kwiatkowski Z., Kunicki-Goldfinger W. i Lorkiewicz Z.: Niektóre własności fizjologiczne pałeczki odmieńca pospolitego w stadium *L* 15
Kwiatkowski Z. — patrz Sander A. i inni
Kwiek S. — patrz Tysarowski W. i inni
Kwiek S. — patrz Tysarowski W. i Kwiek S.
Linde A. — patrz Meduski J. i inni
Lipińska E.: Mikrobiologiczne metody zapobiegania wadom sera wywoływanym przez bakterie kwasu masłowego 271
Lityński T., Jurkowska H. i Pieniak D.: Wpływ fluoru na kropidlaka (*Aspergillus niger*) 147
Lorkiewicz Z., Marciniak B., Żelazna L.: Wpływ niektórych czynników na powstawanie *L* form 27
Lorkiewicz Z. — patrz Kwiatkowski Z. i inni
Luchterowa A. i Markiel E.: Wpływ gazu ziemnego na rozwój bakterii metanowych w glebie 141
Łachecka B.: Drożdże *Schizosaccharomyces pombe* jako zakażenia moszczów owocowych, siarkowanych. Doniesienie. 304
Łagowska M. — patrz Kunicki-Goldfinger W. i inni
Łuczewska J. — patrz Bagdasarian G. i inni
Macander W.: Badania nad prątkami kwasoodpornymi występującymi w wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię 201
Małachowska I. — patrz Meduski J. i inni
Marciniak B. — patrz Lorkiewicz Z. i inni
Markiel E. — patrz Luchterowa A. i Markiel E.
Meduski J., Małachowska I. i Linde A.: Badania nad wpływem warunków hodowli na przebieg czynności enzymatycznych u *Escherichia coli* 53
Meduski J., Zbrożyna A., Zakrzewska A. i Olkowska D.: Badania nad fosfolipazą *C Clostridium perfringens*. Lecytyna wodorowana jako substrat fosfolipazy *C* w środowisku wodnym 73
Meisel H. i Albrycht H.: Wpływ glikozy i żelaza na powstawanie lecytynazy w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens* 77
Meisel H. i Rymkiewicz D.: Antygenowe właściwości zarodników wytwarzanych przez laseczki tężca 79
Meisel H. i Trembowler P.: Analiza własności biochemicznych, serologicznych i toksynotwórczych szczepów *Clostridium sordellii* z uwzględnieniem zmienności 51
Michalska K. — patrz Bagdasarian G. i inni
Mieczyńska A. i Gołębiowska J.: Wpływ mikroflory na pobieranie fosforu przez rośliny uprawne 129
Mierzejewski T. — patrz Parnas J. i Mierzejewski T.
Migdalska B. — patrz Tysarowski W. i inni
Miłkowska A. — patrz Smyk B. i Miłkowska A.
Moycho W. i Gromska W.: Antagonizm występujący w mleku między *Streptococcus lactis* a *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens* . . . 267
Możejko M.: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. Doniesienie. 211
Nowakowska A. — patrz Jakubowska J. i inni
Oberman H. — patrz Jakubowska J. i inni
Odrzywolska A. — patrz Bagdasarian G. i Odrzywolska A.
Odrzywolska A. — patrz Bagdasarian G. i inni
Olkowska D. — patrz Meduski J. i inni
Paluch J. i Dobrzański R.: Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie powierzchniowego zbiornika wodnego w Kozłowej Górze II. Dobowe zmiany zawartości tlenu, biochemicznego zapotrzebowania tlenu, dwutlenku węgla, stężenia jonów wodorowych oraz ilości bakterii i planktonu 181
Paluch J., Radecka S. i Filipowicz J.: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach . . . 187
Paluch J., Radecka S., Zdybiewska M. i Filipowicz J.: Charakterystyka mikrobiologiczna wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze przeznaczonego dla celów wodociągowych 173

Paluch J. i Szymkiewicz A.: Stan bakteriologiczny źródlisk rzeki Wisły na zboczach Baraniej Góry 197
Parnas J.: Próby doświadczalnego przeobrażania cech odmian pałeczek *Brucella* 45
Parnas J. i Chodkowski A.: Zmienność pałeczek *Brucella* kolekcji krajowej 371
Parnas J. i Mierzejewski T.: Badania biochemiczne i immunochemiczne nad pałeczkami *Brucella* 353
Pawełkiewicz J. i Zodrow K.: Synteza kobalamin przez *Corynebacterium diphteriae* 319
Piasecka-Aleksandrowicz J. — patrz Janczura E. i Piasecka-Aleksandrowicz J.
Piechowska M.: Wyosobnienie enzymu bakteryjnego powodującego keratolizę 57
Pieniak D. — patrz Lityński T. i inni
Pliszka A.: Bezpośrednie określanie gronkowcowego czynnika toksycznego w wyciągach z żywności 253
Radecka S. — patrz Paluch J. i inni
Rymkiewicz D. — patrz Meisel H. i Rymkiewicz D.
Sadurska I. — patrz Kowalik R. i Sadurska I.
Sakławska-Szymonowa O. i Gąsior E.: Transaminazy u bakterii. Doniesienie. 105
Sander A., Tabaczyński M. i Kwiatkowski Z.: Typologia form *L* u *Proteus vulgaris* 21
Shugar D. — patrz Jarmolińska A. i Shugar D.
Shugar D. — patrz Baranowska J. i Shugar D.
Smyk B. i Miłkowska A.: Wpływ promieni podczerwonych na dezynfekcję ziarna siewnego 133
Smyk B. i Miłkowska A.: Wpływ nawożenia mineralnego w połączeniu z koszarzeniem na zespoły mikroflory gleb pastwisk górskich 165
Snaglewska J.: Zdrożdżowanie wywaru po fermentacji acetonowobutanolowej. Doniesienie. 303
Snaglewska J.: Oczyszczanie wywaru po fermentacji acetonowobutanolowej na drodze fermentacji beztlenowej 235
Sobieszczański J.: Aparat do badań nad wpływem drobnoustrojów na odżywianie się roślin 109
Sobieszczański J. — patrz Balicka N. i Sobieszczański J.
Stawicki S. i Zodrow K.: Badania nad mikroflorą mączki ziemniaczanej. Doniesienie. 305
Szember A.: Wpływ dodatku tzw. „chwastu rybnego" na rozwój mikroflory w kiszonkach ziemniaczanych 385
Szymkiewicz A. — patrz Paluch J. i Szymkiewicz A.
Szynkiewicz Z.: Próby ekonomicznego wykorzystania mięsa odpadkowego do przygotowania bulionu 89
Szynkiewicz Z.: Czynnik wzrostowy dla włoskowców różycy, zawarty w ekstraktach alkoholowych i acetonowych żółtka jaja kurzego . . . 85
Szynkiewicz Z.: Płynna wzbogacająca pożywka z żółtkiem jaja kurzego do hodowli włoskowca różycy 81
Tabaczyński M. — patrz Sander A. i inni.
Taniewska B. — patrz Joszt A. i inni.
Trembowler P. — patrz Meisel M. i Trembowler P.
Trzebiński M. — patrz Balicka N. i Trzebiński M.
Tysarowski W., Kwiek S. i Migdalska B.: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoodpornych. II. Wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie *Mycobacterium phlei* oraz *Mycobacterium tuberculosis*, szczep *C.* 65
Tysarowski W. i Kwiek S.: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoodpornych. III. Redukcja methemoglobiny przez zawiesiny prątków gruźlicy 69
Wiaterowa A. — patrz Bagdasarian G. i inni.
Wiercieńska D. — patrz Kunicki-Goldfinger W. i inni.
Wróbel T.: Poszukiwanie szybkich metod określania aktywności szczepionek bakteryjnych dla roślin motylkowych 117

Wróbel T. i Gołębiowska J.: Szczepienie bakteriami brodawkowymi roślin motylkowych na różnych typach gleb 121
Wróbel T. — patrz Gołębiowska J. i Wróbel T.
Zakrzewska A. — patrz Meduski J. i inni.
Zbrożyna A. — patrz Meduski J. i inni.
Zdybiewska M. — patrz Paluch J. i inni.
Zieleniewski J. — patrz Ber A. i Zieleniewski J.
Ziołecki A. — patrz Bogdański K. i Ziołecki A.
Zodrow K. — patrz Pawełkiewicz J. i Zodrow K.
Zodrow K. — patrz Stawicki S. i Zodrow K., Doniesienie.
Żelazna I. — patrz Lorkiewicz Z. i inni.

SKOROWIDZ RZECZOWY DO VOL. V

Acetobacter xylinum — wskaźnik ilościowy kwasu pantotenowego (Kurzepa H.) 106
Aceton — wpływ panicyliny na wytwarzanie przez *Clostridium acetobutylicum* (Kocwa E.) 231
Acetonowobutylowa fermentacja — bakteriofagi (Kovats J.) 225
Acetonowobutylowa fermentacja — oczyszczanie wywaru (Snaglewska J.) 235
Acetonowobutylowa fermentacja — zdrożdżowanie wywaru (Snaglewska J.) 303
Alkaloidy — rozkład przez mikroorganizmy glebowe (Możejko M.) . . . 211
Ameba — patrz „Pełzaki"
Anabolizm — powiązanie z katabolizmem u *Pseudomonas extorquens* Bassalik (Janota B.) 104
Antagonizm między *Streptococcus lactis* a *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas flourescens* — w mleku (Moycho W. i Gromska W.) 267
Antagonistyczne promieniowce — patrz „Promieniowce"
Antybiotyki — wpływ na regenerację (Ber A. i Zieleniewski J.) . . 99
Antybiotyki — wpływ na postacie *L Proteus mirabilis* (Horoszewicz A. i Horoszewicz J.) 9
Antybiotyki — badanie wpływu metodą oksytropii (Bagdasarian G. i Odrzywolska A.) 103
Antybiotyki — patrz też „Penicylina" i „dwuhydrostreptomycyna"
Antygenowa budowa — maczugowca błonicy (Kwapiński J.) 321
Antygenowe właściwości zarodników wytwarzanych przez laseczki tężca (Meisel H. i Rymkiewicz D.) 79
Antygenowe właściwości enterotoksyny w hodowlach gronkowców (Burbianka M.) 245
Aspergillus niger — patrz **Kropidlak**
Azotobaktera hodowla — metoda głębinowa (Duda J.) 113
Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis* i *Pseudomonas fluorescens — antagonizm w mleku (Moycho W. i Gromska W.) 267
Bakterie — gonidialne formy (Kunicki-Goldfinger Wł. i inni). . . 41
Bakterie — dobowe zmiany ilości w wodzie zbiornika w Kozłowej Górze (Paluch J. i Dobrzański R.) 181
Bakterie — odczyn fosfatazowy (Kałużewski Z.) 95
Bakterie **octowe** — czynne w tworniku octowym (Jakubowska J). . . 306
Bakterie **termofilne** — patrz „Termofilne bakterie"
Bakteriofagi w fermentacji acetonowobutanolowej (Kovats J.) 225
Bakteriologiczny stan źródlisk rzeki Wisły (Paluch J. i Szymkiewicz A.) 197
Barwienie drobnoustrojów Gramem — rola białek (Baranowska J. i Shugar D.) 100
Barwienie i działanie enzymów na bakterie termofilne (Jarmolińska A. i Shugar D.) 101
Białka — rola w metodyce i lokalizacji barwienia Gramem drobnoustrojów (Baranowska J. i Shugar D.) 100
Błonicy maczugowce — patrz „Maczugowce błonicy"
Brodawkowe bakterie — szczepienie roślin motylkowych na różnych typach gleb (Wróbel T. i Gołębiowska J.) 121
Brodawkowe bakterie — metody określania aktywności szczepionek (Wróbel T.) 117
Brucella — badania biochemiczne i immunochemiczne (Parnas J. i Mierzejewski T.) 353

Brucella — kolekcji krajowej zmienność (Parnas J. i Chodkowski A.) 371
Brucella — próby przeobrażania (Parnas J.) 45
Bulion — wykorzystywanie mięsa odpadkowego (Szynkiewicz Z.) . . 89
Chwast rybny — wpływ na rozwój mikroflory w kiszonkach ziemniaczanych (Szember A.) 385
***Clostridium** acetobutylicum* — wytwarzanie acetonu, wpływ penicyliny (Kocwa E.) 231
Clostridium perfringens — badania nad fosfolipazą *C* (Meduski J. i inni) 73
Clostridium perfringens — wpływ glikozy i żelaza na powstawanie lecytynazy (Meisel M. i Albrycht H.) 77
Clostridium sordelli — własności biochemiczne, serologiczne, toksynotwórcze i zmienność (Meisel M. i Trembowler P.) 51
Clostridium tetani — antygenowe właściwości zarodników (Meisel M. i Rymkiewicz D.) 79
Corynebacterium diphteriae — synteza kobalamin (Pawełkiewicz J. i Zodrow K.) 319
Corynebacterium diphteriae — patrz też „Maczugowce błonicy"
Dekstran — biosynteza przez różne szczepy *Leuconostos mesenteroides* (Januszewicz I.) 217
Dezynfekcja ziarna siewnego — wpływ promieni podczerwonych (Smyk B. i Miłkowska A.) 133
Drobnoustroje — Metody badania metabolizmu ogólnego (Bagdasarian G.) 102
Drobnoustroje, współczynnik ekonomiczny i szybkość zużycia substratu — badanie metodą oksytropii (Bagdasarian G. i inni). 103
Drobnoustroje — usuwanie z surowców owocowych i warzywnych związkami powierzchniowo czynnymi (Horubała A.) 263
Drobnoustroje — wpływ na odżywianie się roślin — aparat do badań (Sobieszczański J.) 109
Drobnoustroje — patrz też „Mikroorganizmy", „Mikroflora"
Drożdże — kiszonek ziemniaczanych (Bujak St. i Kasprzycka A.) . . 401
Drożdże — hodowla na wywarze po fermentacji acetonowo-butanolowej (Snaglewska J.) 303
Drożdże — „Brusznica 7" — wyosobnienie i zbadanie (Jankun A.) . . . 303
Drożdże — wywołujące fermentację syropów owocowych i stężonego soku gronowego — charakterystyka (Dłużewski M.) 241
Drożdże — patrz też *„Saccharomyces"* i *„Schizosaccharomyces"*
Dwuhydrostreptomycyna — wpływ na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daudin (Ber A. i Zieleniewski J.) 99
Dwuhydrostreptomycyna — wpływ na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin (Ber A. i Zieleniewski J.) 100
Enterotoksyny — gronkowcowe — właściwości antygenowe (Burbianka M.) 245
Enterotoksyna — patrz „Toksyczny czynnik" . . . . . .
Enzym bakteryjny powodujący keratolizę — wyosobnianie (Piechowska M) 57
Enzymy, działanie na bakterie termofilne (Jarmolińska A. i Shugar D.) 101
Enzymatyczna aktywność gleby (Balicka N. i Trzebiński M.) . . 377
Enzymatyczne czynności u *Escherichia coli* — wpływ warunków hodowli (Meduski J., Małachowska I. i Linde A.) 53
Enzymy — patrz też „Fosfolipaza", „Lecytynaza", „Transaminazy"
Escherichia coli — wpływ warunków hodowli na przebieg czynności enzymatycznych (Meduski J. i inni) 53
Escherichia coli — żywotność w glebie nawadnianej ściekami miejskimi (Balicka N. i Sobieszczański J.) 207
Escherichia coli — patrz też „Pałeczka okrężnicy"
Fermentacja beztlenowa — oczyszczanie wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej (Snaglewska J.) 303
Fermentacja syropów owocowych i stężonego soku gronowego — charakterystyka drożdży (Dłużewski M.) 241
Fermentacja — patrz też „Acetonowobutylowa fermentacja"
Fluor — wpływ na Kropidlaka (Lityński T., i inni) 147
Fosfatazowy odczyn u różnych gatunków bakterii (Kałużewski S.) . . 95
Fosfolipaza *C Clostridium perfringens* — badania (Meduski J. i inni) . . 73
Fosfolipaza *C* — lecytyna wodorowana jako substrat w środowisku wodnym (Meduski J. i inni) 73

Fosfolipaza — patrz też „Lecytynaza"
Fosfór, pobieranie przez rośliny, wpływ mikroflory (Mieczyńska A. i Gołębiowska J.) 129
Fosforowe związki — przemiany, czynne zespoły mikroflory glebowej — metody badania (Gołębiowska J.) 125
Gaz ziemny — wpływ na rozwój bakterii metanowych w glebie (Luchterowa A. i Markiel E.) 141
Gleba — aktywność enzymatyczna i zawartość witaminu B_2 (Balicka N. i Trzebiński M.) 377
Gleby — mikroflora, zespoły czynne przy przemianach związków fosforowych — metody badania (Gołębiowska J.) 125
Gleba — występowanie promieniowców antagonistycznych (Gołębiowska J. i Wróbel T.) 137
Gleba — rozwój bakterii metanowych, wpływ gazu ziemnego (Luchterowa A. i Markiel E.) 141
Gleba — różne typy, szczepienie roślin motylkowych (Wróbel T. i Gołębiowska J.) 117
Gleba — pastwisk górskich, wpływ nawożenia i koszarzenia na zespoły mikroflory (Smyk B. i Miłkowska A.) 165
Gleba — żywotność *E. coli* i nawadnianie ściekami miejskimi (Balicka N. i Sobieszczański J.) 207
Glebowe — mikroorganizmy, rozkładające alkaloidy (Możejko M.) . . . 211
Glikoza — wpływ na powstawanie lecytynazy w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens* (Meisel M. i Albrycht H.) 77
Glutaminowy kwas — wykorzystanie przez szczep PW_8 maczugowca błonicy Janczura i Piasecka-Aleksandrowicz J. 105
Gonidialne formy bakterii (Kunicki-Goldfinger Wł. i inni) . . . 41
Grama — barwienie, rola białek (Baranowska J. i Shugar D.) . . 100
Gronkowce — własności antygenowe czynnika toksycznego (Burbianka M.) 245
Gronkowce — czynnik toksyczny, bezpośrednie oznaczanie w wyciągach z żywności (Pliszka A.) 253
Gruźlicy prątki — patrz „Prątki gruźlicy", „*Mycobacterium tuberculosis*"
Grzyby drzewne — standartowe kultury do badania wartości grzybobójczej i grzybochronnej (Kluczycki K.) 305
Hemoproteiny — zachowanie się w obecności prątków kwasoodpornych (Tysarowski W. i inni) 65, 69
Hodowla głębinowa — azotobakter a (Duda J.) 113
Jonów wodorowych stężenie — dobowe zmiany w zbiorniku wodnym (Paluch J. i Dobrzański R.) 181
Katabolizm — powiązanie z anabolizmem u *Pseudomonas extorquens* Bassalik (Janota B.) 104
Kazeina — włókiennicza, badanie mikrobiologiczne (Jakubowska J. i inni) 304
Keratoliza — wyosobnienie enzymu bakteryjnego (Piechowska M.) . . 57
Kiszonki ziemniaczane — wpływ dodatku chwastu rybnego na rozwój mikroflory (Szember A.) 385
Kiszonki ziemniaczane — mikroflora drożdżowa (Bujak S. i Kasprzycka A.) 401
Kobalaminy — synteza przez *Corynebacterium diphteriae* (Pawełkiewicz J. i Zodrow K.) 319
Kropidlak — wpływ fluoru (Lityński T. i inni) 147
Lecytyna wodorowana — jako substrat fosfolipazy C w środowisku wodnym (Meduski J. i inni) 73
Lecytynaza — wpływ glikozy i żelaza na powstanie w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens* (Meisel M. i Albrycht H.) 77
Lecytynaza — patrz też „Fosfolipaza"
Leuconostos *mesenteroides* — biosynteza dekstranu (Janusz ewicz I.) . 217
L formy — pałeczki odmieńca — niektóre własności fizjologiczne (Kwiatkowski Z. i inni) 15
L formy — *Proteus vulgaris* — typologia (Sander A. i inni) 21
L formy — wpływ niektórych czynników na powstawanie (Lorkiewicz Z. i inni) 27
L formy — *Proteus mirabilis* — wpływ antybiotyków (Horoszewicz A. i Horoszewicz J.) 9

Ligninosulfonowe kwasy — odbudowa w tlenowych warunkach rzeki (Joszt A. i Gańczarczyk J.) 211
Ligninosulfonowe kwasy — odbudowa metodą osadu czynnego (Joszt A. i inni) 213
Litu chlorek — wpływ na pałeczkę okrężnicy (Kunicki-Goldfinger W. i inni) 33
Maczugowce błonicy — przemiana materii (Bagdasarian G. i Hulanicka D. i inni) 104
Maczugowce błonicy — szczep PW_8, wykorzystanie siarki kwasu glutaminowego (Janczura E. i inni) 105
Maczugowce błonicy — budowa antygenowa (Kwapiński J.) 321
Maczugowce błonicy — patrz też „*Corynebacterium diphteriae*"
Mączka ziemniaczana — mikroflora (Stawicki St. i Zodrow K.) . . 305
Metabolizm ogólny drobnoustrojów — metoda badania (Bagdasarian G.) 102
Metabolizm — patrz też „Anabolizm" i „Przemiana materii"
Metanowe bakterie — wpływ gazu ziemnego na rozwój w glebie (Luchter A. i Markiel E.) 141
Methemoglobina — redukcja przez zawiesiny prątków gruźlicy (Tysarowski W. i inni) 69
Methemoglobina — wpływ na oddychanie *Mycobacterium phlei* oraz *Mycobacterium tuberculosis*, szczep C (Tysarowski W. i inni) 65
Mikroflora — niszcząca papier, skórę i pieczęcie woskowe (Kowalik R. i Sadurska I.) 277
Mikroflora — mączki ziemniaczanej (Stawicki S. i Zodrow K.) . . 305
Mikroflora — glebowa, zespoły czynne przy przemianach związków fosforowych w glebie — metody badania (Gołębiowska J.) 125
Mikroflora — wpływ na pobieranie fosforu przez rośliny uprawne (Mieczyńska A. i Gołębiowska J.) 129
Mikroflora — gleb pastwisk górskich — wpływ nawożenia mineralnego w połączeniu z koszarzeniem (Smyk B. i Miłkowska A.) 165
Mikroflora — w kiszonkach ziemniaczanych (Szember A.) 385
Mikroflora — drożdżowa w kiszonkach ziemniaczanych (Bujak S. i Kasprzycka A.) 401
Mikroflora — kazeiny włókienniczej (Jakubowska J.) 304
Mikroorganizmy glebowe — rozkład alkaloidów (Możejko M.) . . . 211
Mikroorganizmy — niszczące oprawy książkowe ze skóry (Kowalik R. i Sadurska I.) 285
Mikroorganizmy — niszczące tkaniny bawełniane i wełniane (Kowalik R. i Czerwińska E.) 291
Mikroorganizmy — patrz też „Drobnoustroje"
Mleko — antagonizm między *Str. lactis*, *B. subtilis* i *Ps. fluorescens* (Moycho W. i Gromska W.) 267
Moszcze, zastosowanie własności pektolitycznych niektórych pleśni do klarowania (Bogdański K. i Ziołecki A.) 411
Moszcze — patrz też „Owocowe moszcze"
Mycobacterium *phlei* — wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie (Tysarowski W. i inni) 65
Mycobacterium tuberculosis, wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie (Tysarowski W. i inni) 65
Mycobacterium tuberculosis — patrz też „Prątki gruźlicy"
Nawożenie — mineralne, wpływ na zespoły mikroflory gleb pastwisk górskich (Smyk B. i Miłkowska A.) 165
Octowe bakterie — patrz „Bakterie octowe"
Octowy twornik — wyodrębnienie i charakterystyka czynnych bakterii (Jakubowska J.) 306
Oksyhemoglobina — wpływ na oddychanie *Mycobacterium phlei* oraz *Mycobacterium tuberculosis*, szczep C (Tysarowski i inni) 65
Oksytropii metoda — badanie podłoży bakteryjnych i standaryzacja zawiesin (Bagdasarian i inni) 102
Oksytropii metoda — badania nad współczynnikiem ekonomicznym i szybkością zużycia substratu przez drobnoustroje (Bagdasarian i inni) 103
Oksytropia — substratów bakteryjnych, wpływ antybiotyków (Bagdasarian G. i Odrzywolska A.) 103

Osad czynny — odbudowa kwasów lignosulfonowych (Joszt A., i inni) 213
Owocowe — moszcze, zakażenie przez *Schizosaccharomyces pombe* (Łachecka B.) 304
Owocowe — surowce, zastosowanie związków powierzchniowoczynnych do usuwania drobnoustrojów (Horubała A.) 263
Owocowe — syropy, fermentacja, charakterystyka drożdży (Dłużewski M.) 241
Pałeczka odmieńca pospolitego — niektóre własności fizjologiczne w stadium *L* (Kwiatkowski Z. i inni) 15
Pałeczki odmieńca — patrz też „*Proteus*"
Pałeczka okrężnicy — wpływ chlorku litu (Kunicki-Goldfinger i inni) 33
Pałeczki okrężnicy — patrz też „*Escherichia coli*"
Pantotenowy kwas — *A. xylinum* jako wskaźnik ilościowy (Kurzepa H.) 106
Papier — mikroflora niszcząca (Kowalik E. i Sadurska I.) . . . 277
Papier — zabytkowy — Penicillia niszczące (Czerwińska E. i Kowalik R.) 299
Pektolityczne własności niektórych szczepów pleśni — zastosowanie w klarowaniu moszczów (Bogdański K. i Ziołecki A.) 411
Pełzaki — glebowe, śmiertelne zakażenie bakteryjne (Drożański W.) . . 315
Penicillia niszczące papier zabytkowy (Czerwińska E. i Kowalik R.) 299
Penicillium — wytwarzanie czynników wzrostowych dla *Saccharomyces cerevisiae* (Ber A. i Dryzek L.) 99
Penicillium chrysogenum — wyciągi wodne grzybni — wpływ na wzrost kijanek *Xenopus laevis* D. (Ber A. i Zieleniewski J.) 100
Penicylina, biała krystaliczna i dwuhydrostreptomycyna — wpływ na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daudin (Ber A. i Zieleniewski J.) 99
Penicylina, żółta i biała — wpływ na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin (Ber A. i Zieleniewski J.) 100
Penicylina — wpływ na wytwarzanie acetonu przez *Clostridium acetobutylicum* (Kocwa E.) 231
Penicylina — wpływ na postacie *L Proteus mirabilis* (Horoszewicz A. i Horoszewicz J.) 9
Plankton — dobowe zmiany ilości w zbiorniku w Kozłowej Górze (Paluch J. i Dobrzański R.) 181
Pleśnie — własności pektolityczne — zastosowanie do klarowania moszczów (Bogdański K. i Ziołecki A.) 411
Pleśnie — patrz też „*Penicillium*" i „Kropidlak"
Podłoża — szybkość zużycia przez drobnoustroje — badanie metodą oksytropii (Bagdasarian G. i inni) 103
Podłoża — bakteryjne, badanie metodą oksytropii (Bagdasarian G. i inni) 103
Powierzchniowoczynne związki, zastosowanie do usuwania drobnoustrojów z owoców i warzyw (Horubała A.) 263
Powietrze magazynów archiwalnych — mikroflora niszcząca papier, skórę i pieczęcie woskowe (Kowalik R. i Sadurska I.) 277
Pożywka — płynna wzbogacająca z żółtkiem jaja kurzego do hodowli włoskowca różycy (Szynkiewicz Z.) 81
Pożywka — patrz też „Bulion" i „Podłoża"
Prątki kwasoodporne — zachowanie się hemoprotein w ich obecności (Tysarowski W. i inni) 65
Prątki kwasoodporne — w wodzie rzecznej (Macander W.) 201
Prątki gruźlicy, zawiesina — redukcja methemoglobiny (Tysarowski W. i Kwiek S.) 69
Prątki gruźlicy — patrz też „*Mycobacterium tuberculosis*"
Promienie podczerwone — wpływ na dezynfekcję ziarna siewnego (Smyk B. i Miłkowska A.) 133
Promieniowce, antagonistyczne — występowanie w różnych glebach (Gołębiowska J. i Wróbel T.) 137
Proteus *mirabilis*, postacie *L* — wpływ penicyliny i innych antybiotyków Horoszewicz A. i Horoszewicz J.) 9
Proteus vulgaris — typologia form L (Sander A. i inni) 21
Proteus — patrz też „Pałeczka odmieńca"

Próba reduktazowa — zastosowanie do warzyw i produktów warzywnych (Jakubczyk T.) 259
Przemiana materii maczugowców błonicy (Bagdasarian G. i inni) . . 104
Przemiana materii — patrz też „Metabolizm"
Przeobrażenie cech u *Brucella* (Parnas J.) 45
Pseudomonas *extorquens* Bassalik — powiązanie anabolizmu z katabolizmem (Janota B.) 104
Pseudomonas fluorescens, Str. lactis, B. subtilis — antagonizm w mleku (Moycho W. i Gromska W.) 267
Reduktazowa próba — próby zastosowania do warzyw (Jakubczyk T.) . 259
Regeneracja — wpływ antybiotyków (Ber A. i Zieleniewski J.) . . 99
Rośliny — odżywianie się — aparat do badań (Sobieszczański J.) . . 109
Rośliny — uprawne, wpływ mikroflory na pobieranie fosforu (Mieczyńska A. i Gołębiowska J.) 129
Rośliny, motylkowe — metody określania aktywności szczepionek bakteryjnych (Wróbel T.) 117
Rośliny, motylkowe — szczepienie bakteriami brodawkowymi na różnych typach gleb (Wróbel T. i Gołębiowska J.) 121
Różycy włoskowce — patrz „Włoskowce różycy"
Saccharomyces *cerevisiae* — czynniki wzrostowe wytwarzane przez *Penicillium* (Ber A. i Dryzek L.) 99
Saccharomyces — patrz też „Drożdże"
Schizosaccharomyces *pombe* — zakażenie moszczów owocowych, siarkowanych (Łachecka B.) 304
Sery, mikrobiologiczne zapobieganie wadom wywoływanym przez bakterie kwasu masłowego (Lipińska E.) 271
Siarka — wykorzystanie przez szczep PW_8 maczugowca błonicy (Janczura E. i Piasecka-Aleksandrowicz J.) 105
Skóra — oprawy książkowe — mikroorganizmy niszczące (Kowalik R. i Sadurska I.) 285
Skóra — mikroflora niszcząca (Kowalik R. i Sadurska I.) . . . 277
Streptococcus *lactis, B. subtilis, Ps. fluorescens* — antagonizm w mleku (Moycho W. i Gromska W.) 267
Szczepionki bakteryjne dla roślin motylkowych — metody określania aktywności (Wróbel T.) 117
Szczepienie bakteriami brodawkowymi roślin motylkowych na różnych typach gleb (Wróbel T. i Gołębiowska J.) 121
Ścieki — po przejściu przez oczyszczalnię — wpływ na występowanie prątków kwasoodpornych w wodzie rzecznej (Macander W.) 201
Ścieki, przemysłowe — znaczenie doboru biocenoz swoistych do oczyszczania (Kluczycki K.) 214
Ścieki — odbudowa kwasów ligninosulfonowych w tlenowych warunkach rzeki (Joszt A. i Gańczarczyk J.) 211
Ścieki — odbudowa kwasów ligninosulfonowych metodą osadu czynnego (Joszt A. i inni) 213
Termofilne bakterie, żywe i zabite, barwienie i działanie enzymów na nie (Jarmolińska A. i Shugar D.) 101
Tężca laseczki — antygenowe właściwości zarodników (Meisel H. i Rymkiewicz D.) 79
Tkaniny bawełniane i wełniane — mikroorganizmy niszczące (Kowalik T. i Czerwińska E.) 291
Toksyczny czynnik — w hodowlach gronkowców, właściwości antygenowe (Burbianka M.) 245
Toksyczny czynnik — gronkowcowy, bezpośrednie oznaczanie w wyciągach z żywności (Pliszka A.) 253
Toksynotwórcze, biochemiczne i serologiczne własności *Clostridium sordelli* (Meisel H. i Trembowler P.) 51
Transaminazy — u bakterii (Sakławska-Szymonowa O. i Gąsior E.) 105
Warzywa — zastosowanie związków powierzchniowoczynnych do usuwania drobnoustrojów (Horubała A.) 263
Witamina B_2, zawartość w glebie (Balicka N. i Trzebiński M.) . 377
Witaminy — patrz też „Wzrostowe czynniki", „Kobalaminy", „Pantotenowy kwas"

Włoskowce różycy — pożywka płynna wzbogacająca z żółtka jaja kurzego (Szynkiewicz Z.) 81
Włoskowce różycy — czynnik wzrostowy zawarty w ekstraktach alkoholowych i acetonowych żółtka jaja kurzego (Szynkiewicz Z.) . . . 85
Woda — charakterystyka mikrobiologiczna zbiornika w Kozłowej Górze (Paluch J. i inni) 173
Woda — dynamika przemiany materii w zbiorniku w Kozłowej Górze (Paluch J. i Dobrzański R.) 181
Woda — stan sanitarny górnego biegu Wisły i terenu zalewu w Goczałkowicach (Paluch J. i inni) 187
Woda — stan bakteriologiczny źródlisk rzeki Wisły (Paluch J. i Szymkiewicz A.) 197
Woda — rzeczna, prątki kwasoodporne, występowanie (Macander W.) . . 201
Woskowe pieczęcie — mikroflora niszcząca (Kowalik R. i Sadurska I.) 277
Współczynnik ekonomiczny, zużycia substratu — badanie metodą oksytropii (Bagdasarian G. i inni) 103
Wzrostowy czynnik — dla włoskowców różycy zawarty w żółtku jaja kurzego (Szynkiewicz Z.) 85
Wzrostowe czynniki — dla *S. cerevisiae* wytwarzane przez *Penicillium* (Ber A. i Dryzek L.) 99
Wzrostowy czynnik — patrz też „Witaminy", „Kobalaminy" i „Pantotenowy kwas"
Xenopus laevis D, regeneracja kończyn — wpływ antybiotyków (Ber A. i Zieleniewski J.) 99
Xenopus laevis D, wzrost kijanek — wpływ penicyliny, dwuhydrostreptomycyny (Ber A. i Zieleniewski J.) 100
Zakażenie bakteryjne — u pełzaków glebowych (Drożański W.) . . . 315
Zarodniki laseczek tężca — antygenowe właściwości (Meisel H. i Rymkiewicz D.) 79
Zawiesiny bakterii — badanie metodą oksytropii (Bagdasarian G. i inni) 103
Zdrożdżowanie — wywaru po fermentacji acetonowobutanolowej (Snaglewska J.) 303
Ziarno siewne, dezynfekcja, wpływ promieni podczerwonych (Smyk B. i Miłkowska A.) 133
Zmienność — *Brucella* — (Parnas J. i Chodkowski A.) 371
Zmienność — *Clostridium sordelli* (Meisel M. i Trembowler P.) . . 51
Zmienność — patrz też *„Przeobrażenie"*
Żelazo — wpływ na powstawanie lecytynazy w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens* (Meisel M. i Albrycht H.) 77
Żywność, bezpośrednie oznaczanie gronkowcowego czynnika toksycznego w wyciągach (Pliszka A.) 253

SPIS RZECZY — СОДЕРЖАНИЕ — CONTENTS

1. W. Drożanski: Fatal bacterial infection in soil amoebae — Śmiertelne zakażenie bakteryjne u pełzaków glebowych 315
2. J. Pawełkiewicz and K. Zodrow: The synthesis of cobalamins by *Corynebacterium diphteriae* — Synteza kobalamin przez *Corynebacterium diphteriae* 319
3. J. Kwapiński: Badania nad budową antygenową maczugowca błonicy — Investigations on the antigenic constituents of *Corynebacterium diphteriae* 321
4. J. Parnas i T. Mierzejewski: Badania biochemiczne i immunochemiczne nad pałeczkami *Brucella* — Biochemical and immunochemical studies on *Brucella* 353
5. J. Parnas i A. Chodkowski: Zmienność pałeczek *Brucella* kolekcji krajowej — Colonial variation in *Brucella* 371
6. N. Balicka i M. Trzebiński: Aktywność enzymatyczna i obecność witaminy B_2 w glebie — The enzymic activity and the amount of vitamin B_2 in soil 377
7. A. Szember: Wpływ dodatku tzw. „chwastu rybnego" na rozwój mikroflory w kiszonkach ziemniaczanych — The influence of the admixture of fish meat on the microflora of potato silages 385
8. S. Bujak i A. Kasprzycka: Mikroflora drożdżowa kiszonek ziemniaczanych — Дрожжевая микрофлора в картофельном силосе. . . . 401
9. K. A. Bogdański i A. Ziołecki: Własności pektolityczne niektórych szczepów pleśni w zastosowaniu do klarowania moszczów — Пектолитические свойства некоторых штаммов плесневых грибков 411
Skorowidz autorów do vol. V 417
Skorowidz rzeczowy do vol. V 422

Cena zł 30.—

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

MIĘDZYNARODOWY ZWIĄZEK TOWARZYSTW MIKROBIOLOGICZNYCH (A.I.S.M.) ZAWIADOMIŁ POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW, ŻE MIĘDZYNARODOWY KONGRES MIKROBIOLOGÓW ODBĘDZIE SIĘ W SZTOKHOLMIE W SIERPNIU 1958 R.